

**Vergleich der Interleukin- und CD154-
Expression in T-Zell-Kulturen von gesunden und allergischen
Kindern vor und nach spezifischer Immuntherapie**

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität

von Anja Keil
geboren am 06.06.1975 in Sondershausen

Erster Gutachter: PD Dr. med. U. R. Markert

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. C. Kroegel

Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. G. Zwacka

Tag der öffentlichen Verteidigung: 09.01.2006

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ARIA	Allergy Rhinitis and its affect on Asthma
APC	Antigen präsentierende Zellen
BDT	Basophil-Degranulationstest
CAST	Zellulärer Antigen Stimulationstest
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	clonale-DNA
CIE	gekreuzte Immunelektrophorese
ECP	Eosinophil Cationic Protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
ICS	Intracellular Staining
IFN	Interferon
IgA, IgG, IgM, IgE	Immunglobulin (A, G, M, E)
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
MACS	Magnetic Associated Cell Sorter
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger-RNA
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat Buffered Saline
PERCP	Peridinin chlorophyll protein
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
RAST-Klasse	Radio-Allergen-Sorbent-Test
RPE	R-phycoerythrin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCIT	Subkutane Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
SIT	Spezifische Immuntherapie
SSC	Sideward Scatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STU	Spezifische Behandlungseinheit
Th	T-Helfer-Zelle
TGF	Transforming Growth Factor

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Inhaltsverzeichnis	2
Zusammenfassung	4
1. Einleitung	6
1.1 Allgemeines, Terminologie	6
1.2 Pathogenese	7
1.3 Allergene	11
1.4 Epidemiologie	12
1.5 Diagnostik	15
1.6 Therapie allergischer Erkrankungen	16
1.6.1 Prävention	16
1.6.2 Symptomatische Therapie	16
1.6.3 Spezifische Immuntherapie	18
1.6.4 Weitere Therapieansätze	22
2. Ziele der Arbeit	23
3. Material und Methoden	25
3.1 Patientenauswahl und Blutprobengewinnung	25
3.2 Dosierung, Art und Dauer der Anwendung von Pangramin SLIT®	25
3.3 Arbeitsbedingungen	28
3.4 Plasmaisolierung	28
3.5 Durchführung eines Ficoll-Dichtegradienten	28
3.6 Separation der B- und T-Zellen	29
3.7 Durchflußzytometrie-FACS	30
3.7.1 Untersuchung der Expression von CD154, IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 in T-Zellen	30
3.7.2 Auswertung der intrazellulären Färbung (ICS)	32
3.8 Statistik	33

3.9 Puffer und Reagenzien	34
3.10 Herstellerangaben	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Darstellung der FACS-Ergebnisse	36
4.2 CD154	37
4.3 IFN- γ	39
4.4 IL-2	41
4.5 IL-4	43
4.6 IL-10	45
5. Diskussion	47
5.1 CD154	48
5.2 IFN- γ /IL-2	49
5.3 IL-4	52
5.4 IL-10	53
5.5 Klinik	54
5.6 Kritische Betrachtung der Methodik	55
5.7 Allergie-Spezifische oder unspezifische Erkrankung?	58
5.8 Studententabelle zur SLIT	59
6. Zusammenfassung	61
Anhang	63
Abbildungsverzeichnis	63
Tabellenverzeichnis	64
Literaturverzeichnis	65
Danksagung	82
Ehrenwörtliche Erklärung	83
Lebenslauf	84
Publikationen	85

Zusammenfassung

Einleitung: Der Behandlung allergischer Erkrankungen kommt bei steigender Inzidenz ein großer Stellenwert zu. Dabei stellt die spezifische Immuntherapie die einzige kausale Methodik in der Behandlung dar. Durch wiederholte Gabe eines relevanten Allergens wird die klinische Verträglichkeit dieses Allergens induziert. Im Gegensatz zur symptomatischen Therapie kann sie den Verlauf allergischer Erkrankungen beeinflussen, das Risiko für Asthma und die Sensibilisierung auf weitere Allergene verhindern. Das Interesse an alternativen Immuntherapien, die nicht injiziert werden müssen, ist groß. Die seltenen, aber möglichen schweren Nebenwirkungen der traditionellen subkutan applizierten Immuntherapie, die Invasivität, die viele Patienten, besonders Kinder zum Teil schlecht tolerieren und das häufige Aufsuchen eines Arztes für die Gabe sind Nachteile dieser Therapie. Die sublinguale Immuntherapie (SLIT) ist seit mehreren Jahren besonders bei der Behandlung von Kindern weit verbreitet. Trotz der inzwischen großen Anzahl von Studien, die dieser Therapieform eine gute Wirksamkeit mit einer geringen Nebenwirkungsrate nachweisen, gibt es weiterhin Vorbehalte über die Anwendung der SLIT. Dazu gehören unter anderem, dass die Wirkungsweise nicht geklärt ist, die empfohlene Dauer der Therapie schwankt, sowie Unsicherheiten bei der Wahl der optimalen Dosis mit einem definierten Dosis-Wirkungs-Verhältnisses bestehen. In dieser Arbeit sollten immunologische Effekte der SLIT über zwei bis drei Jahre verglichen werden. Dafür wurden Interleukin (IL)-2 und Interferon- γ (IFN- γ) als Vertreter der Th1-Interleukine und IL-4 als Th2- Interleukin, sowie IL-10 als regulatorisches Zytokin in Lymphozyten aus peripherem Venenblut gemessen. Des Weiteren sollte die Expression von CD-154 (CD40-Ligand), einem Oberflächenmolekül auf T-Zellen, das am Immunglobulin-Klassenwechsel zum IgE maßgeblich beteiligt ist, gemessen werden.

Patientenauswahl: Die Blutproben stammen von Kindern aus der Ambulanz des Robert-Koch-Krankenhauses Apolda, die dort auf Grund ihrer allergischen Erkrankung in Behandlung waren. Insgesamt wurde Blut von 92 Kindern analysiert; 48 Kinder hatten Allergien gegen Gräserpollen, Birken- und Haselpollen oder Hausstaubmilben; 44 Blutproben wurden von Probanden untersucht. Die Patienten erhielten über zwei bis drei Jahre eine SLIT, und es wurden in regelmäßigen Abständen vor und während der Therapie Blutproben zur Analyse entnommen. Die gemessenen Daten wurden mit denen aus der Dissertation von Dr. med. Claudia Bär verglichen, die als Ausgangswerte derselben Patienten vor Therapiebeginn dienten.

Methoden: Aus dem Blut der Patienten wurden mittels Ficoll-Gradient die Lymphozyten isoliert und anschließend für zytologische Untersuchungen B- und T-Zellen durch MACS (magnetic activated cell sorter) separiert. Die T-Zellen wurden unspezifisch mit PMA und Ionomycin stimuliert und anschließend mit Monensin sekretionsgehemmt. Nach Fixation der Zellen erfolgte die intrazelluläre Markierung von IFN- γ , IL-2, -4, -10, sowie CD154. Danach wurde mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) die spezifische Expression der oben genannten Zytokine und des Oberflächenmarkers bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mit den Negativkontrollen und den Werten vor Therapie verglichen.

Ergebnisse: Vor einer SLIT wiesen die Allergiker eine signifikant erhöhte CD154-Produktion gegenüber der Kontrollgruppe auf. Im Therapieverlauf zeigte sich eine deutliche Abnahme dieser Expression im Vergleich mit den Ausgangswerten vor Therapie. Die Expression von IFN- γ nahm unter Therapie leicht, jedoch nicht signifikant zu. IL-10 zeigte nach unspezifischer Stimulation eine signifikante Zunahme der Expression unter Therapie bei Betrachtung der gesamten Allergiegruppe. Die höchsten Werte fanden sich nach zwei bis dreijähriger SLIT. Für IL-2 und IL-4 zeigten sich unter Therapie Anstiege der Expression. Eine signifikante Änderung des Th1/Th2-Verhältnisses konnte nicht beobachtet werden.

Diskussion: CD154 ist entscheidend am Immunglobulinklassenwechsel zur Produktion von IgE beteiligt. Die verminderte Expression dieses Oberflächenmoleküles unter SLIT könnte durch eine unterdrückte IgE-Produktion nach Allergenkontakt zu einer Verbesserung der Symptomatik führen. Die erhöhte Produktion von IL-10, das wichtige immunregulatorische/-inhibitorische Fähigkeiten hat, kann zu einer Anergie gegenüber dem Allergen führen und ebenfalls eine allergische Symptomatik abschwächen. Unter Therapie kam es zu einer deutlichen Besserung des subjektiven Befindens der Patienten. Das Th1/Th2-Verhältnis änderte sich aufgrund eines parallelen Anstieges der Th1-Interleukine IFN- γ und IL-2 sowie des Th2-Interleukins IL-4 nur unwesentlich zu Gunsten von Th1. Der häufig beschriebene Ausgleich des bei Atopikern zu findenden Ungleichgewichtes unter spezifischer Immuntherapie war in unserer Untersuchung nicht signifikant.

Schlussfolgerung: Anhand der untersuchten Zytokine konnten immunologische Effekte der Therapie gezeigt werden. Die verminderte Expression von CD154 sowie die erhöhte Expression von IL-10 könnten eine wichtige Rolle für die Verbesserung der klinischen Symptomatik spielen.

1. Einleitung

1.1 Allgemeines und Terminologie

Der Begriff Allergie wurde erstmals 1906 von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet erwähnt. Er bezeichnete damit eine veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus aufgrund einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die z.B. durch Injektion von Fremdeiweiß in den Körper ausgelöst wird [Pirquet 1906].

Die Allergie ist heute als eine individuelle Änderung der immunologischen Reaktionsbereitschaft im Sinne einer übersteigerten, krankmachenden Immunantwort (Hypersensitivität) gegen körperfremde Allergene (Antigene) definiert. Diese sind bei physiologischer Immunitätslage apathogen, rufen also von sich aus keine Schädigung hervor. Eingeteilt werden sie nach der Art der Exposition in Inhalations-, Ingestions-, Kontakt- und Injektionsallergene. Voraussetzung für eine allergische Reaktion ist die Sensibilisierung des Organismus mit dem Allergen. Es bedarf einer zumindest einmaligen Exposition mit dem Allergen oder einer molekular ähnlich konfigurierten kreuzreaktiven Substanz. Erst bei wiederholtem Kontakt kann eine echte allergische Reaktion auftreten.

1923 prägten Coca und Cooke den Begriff des atopischen Ekzems, das eine chronische juckende Entzündung der Epidermis und Dermis bezeichnet, die häufig mit einer positiven Familien- und Eigenanamnese bezüglich Asthma, allergischer Rhinitis oder Konjunktivitis assoziiert ist [Coca AF 1923]. Die Einteilung der Allergie erfolgt nach Coombs und Gell (1963) in 3 überwiegend durch humoral unterhaltene Frühreaktionen und eine zellulär vermittelte Spätreaktion, wobei diese Formen nicht isoliert, sondern zum Teil parallel ablaufen oder ineinander übergehen [Coombs RRA 1963]. Davon zu unterscheiden sind Pseudoallergien, die eine nicht IgE vermittelte Pathogenese aufweisen. Deren Symptomatik ist mit den allergischen vergleichbar. Sie treten schon bei einmaligem Kontakt mit einer bestimmten Substanz zum Beispiel Antibiotika auf. Es besteht aber eine Abhängigkeit von der pharmakologischen Wirkung und nicht von der chemischen Struktur des auslösenden Stoffes.

Die Identifikation von Histamin als Mediator durch Dale und Laidlaw 1910, der Nachweis der Übertragbarkeit der Typ-1-Allergie mittels Serum durch Prausnitz und Küster 1921 und die Identifikation des IgE Moleküls durch das Ehepaar Ishizaka sowie Johansson und Bennich

1967 waren Meilensteine in der Erforschung der Allergie [Dale HH 1910; Prausnitz C 1921; Ishizaka K 1966; Ishizaka K 1966; Johansson 1967].

In den letzten Jahrzehnten kam es zu einem deutlichen Anstieg allergischer Erkrankungen wie Rhinitis, Asthma und atopischer Dermatitis. Genaue Angaben für die Prävalenz in Deutschland existieren nicht, aber man geht davon aus, dass bis zu 10% der Bevölkerung an Asthma, 10 bis 15% an Rhinokonjunktivitis und 5 bis 10 % an atopischer Dermatitis leiden [ISAAC 1998; Williams, Robertson et al. 1999]. Dies bedeutet neben den physischen und psychischen Einschränkungen der allergisch Erkrankten eine große Belastung für die Gesundheitssysteme und stellt eine Herausforderung für die Wissenschaft dar, Ursachen für diese Zunahme zu finden, die Therapie zu verbessern und Präventionsstrategien zu entwickeln [Kurz and Riedler 2003].

1.2 Pathogenese

Unter natürlichen Expositionsbedingungen sind die Epithelien von Haut und Schleimhäuten der primäre Ort des Allergenkontaktes. Das Schleimhautepithel und die Epidermis sind dicht mit hoch spezialisierten Leukozyten, den dendritischen Zellen besiedelt. Die besondere Mobilität ermöglicht es ihnen, Allergene vom Ort der primären Exposition (Epithel) zu regionären Lymphknoten zu transportieren. Dabei erfahren sie einen funktionellen Wandel, der sie zu potenten antigenpräsentierenden Zellen (APC) werden lässt, die in der Lage sind, durch Aktivierung von allergenspezifischen T-Zellen auch adaptive Immunantworten zu induzieren. Dendritische Zellen unterscheiden sich von anderen APC (Makrophagen, B-Zellen) durch ihre Fähigkeit, ruhende, native T-Zellen zu aktivieren und darüber hinaus die Differenzierung der T-Zellen zu programmieren [Banchereau and Steinman 1998]. Manche Allergene scheinen aufgrund ihrer intrinsischen, enzymatischen Aktivität direkt dendritische Zellen aktivieren zu können, wie es kürzlich von Hammad et al. für das Hauptantigen der Hausstaubmilbe (Der p1) gezeigt wurde [Hammad, Charbonnier et al. 2001]. Die Aktivierung der Zellen kann auch indirekt erfolgen. Störungen der epithelialen Homöostase durch Allergenexposition, aufgrund gleichzeitiger oder vorangegangener mikrobieller Infektionen sowie chemische oder physikalische Umweltfaktoren können die lokale Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen verursachen [Jakob and Udey 1999]. Die Antigenaufnahme erfolgt über eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen, wie zum Beispiel Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose [Lambrecht 2001]. Hierbei entstehen Peptidfragmente, die im MHC-II-Kompartiment von MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden und zur Antigenpräsentation als Peptid-MHC-Komplex in hoher Dichte an der Zelloberfläche

exprimiert werden. In bereits sensibilisierten Individuen erfolgt die Aufnahme vermutlich hauptsächlich durch rezeptorvermittelte Endozytose, wie zum Beispiel die Internalisierung von IgE-gebundenem Allergen über den hochaffinen IgE-Rezeptor, der das Allergen gezielt in das MHC-II-Kompartiment transportiert [Kripke ML 1990]. Voraussetzung für eine T-Zellaktivierung in den regionären Lymphknoten ist einerseits eine ausreichende Ligation multipler peptidspezifischer T-Zell-Rezeptoren durch multiple Peptid-MHC-Komplexe, die an der Zelloberfläche der APC präsentiert werden. Zum anderen sind kostimulatorische Signale erforderlich. Diese umfassen lösliche Mediatoren wie Interleukine und membranständige Moleküle wie CD40, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2). CD40 und Moleküle der B7 Gruppe, die von B-Zellen exprimiert werden, binden an ihren Gegenrezeptoren (CD154 und CD28/CTLA-4) auf der Oberfläche von T-Zellen. Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und ICAM-1 stabilisieren den Zell-zu-Zell-Kontakt.

Das Endresultat ist die Zellteilung der peptidspezifischen T-Zellen und deren Differenzierung zu Effektorzellen. Gleichzeitig erfolgt die Polarisierung der T-Zellen. Eine Vielzahl von Signalen, die von den verschiedenen APC in unterschiedlichem Ausmaß generiert werden, modulieren die T-Zell-Polarisierung. Dazu gehören u.a. Zytokine wie das Th1 fördernde IL-

12 und IFN- α oder das regulatorisch wirkende IL-10, das Ausmaß und die Kostimulation, wobei hier CD40 und CD80 eher Th1- und CD86 und OX40L eher Th2-dominierte Immunantworten fördern. Die Entwicklung zu einer bestimmten T-Helfer-Zelle ist abhängig vom Subtyp und Reifungsgrad der APC, der

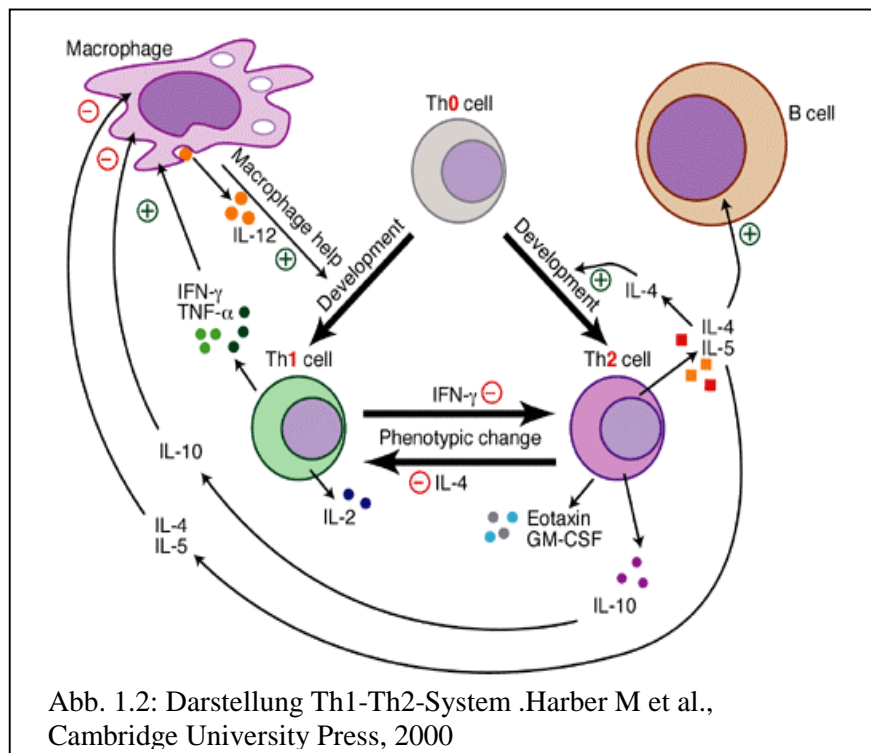


Abb. 1.2: Darstellung Th1-Th2-System .Harber M et al., Cambridge University Press, 2000

Antigendosis und -art sowie der Dauer und Affinität der Interaktion zwischen APC und T-Zelle [Kahlert, Grage-Griebenow et al. 2000]. CD3⁺T-Zellen können in CD8⁺-Zytotoxische-Zellen (CD8⁺T-Suppressorzellen) und CD4⁺T-Helfer-Zellen und diese wiederum entsprechend ihrer Interleukinproduktion in Th0-, Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden.

Th1- und Th2-Zellen entwickeln sich aus Th0-Zellen (Abb. 1.2). Neben diesen beiden wurden als weitere Th-Effektorzellen Th3-Zellen identifiziert. Sie sekretieren TGF β , IL-4 und IL-10 und spielen eine wichtige Rolle bei der oralen Immuntoleranz. Weiterhin induzieren sie B-Zellen zur IgA-Produktion [Weiner 2001]. Die Unterteilung der antigenstimulierten T-Helfer-Zellen basiert im wesentlichen auf der Analyse der freigesetzten Zytokine und kann zwei klassischen Effektortypen zugeordnet werden. Die so genannte Typ-1-T-Helfer-Zelle (Th1) ist durch Sekretion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- β charakterisiert. [Parronchi P 1996; Gehring S 1998] Ihr „Gegenspieler“ ist die Typ-2-T-Helfer-Zelle (Th2), die durch Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und IL-10 gekennzeichnet ist. IL-10 ist ein Zytokin mit starken antiinflammatorischen Eigenschaften und gilt als potenzieller Modulator sowohl der Th1- als auch der Th2-induzierten Entzündungsreaktion. Daneben werden weitere Zytokine einschließlich chemotaktischer Faktoren von beiden Subpopulationen produziert. Th1-Zellen sind an der Abwehr von Infektionserregern wie Bakterien, Pilzen und Viren beteiligt. Das von ihnen sekretierte IFN- γ ist ein potenter Makrophagenaktivator und induziert B-Zellen zur IgG-Produktion. Th2-Zellen sind wesentlich an der Ausbildung der humoralen Immunantwort einschließlich der IgE-Produktion sowie chronischen Graft versus Host Diseases beteiligt. Sie spielen bei der Abwehr von Helmintheninfektionen und bei Allergien vom Soforttyp eine zentrale Rolle. Die von Th2-Zellen sekretierten Zytokine IL-4 und IL-13 wirken synergistisch auf die IgE-vermittelte Typ-1-Reaktion; sie induzieren beide den IgE-Klassenwechsel in B-Zellen, während IL-4 zudem ein Mastzellaktivator ist. Darüber hinaus führt es zur Steigerung der MHC-II-, CD23- und CD40-Expression auf B-Zellen, zur Förderung von Th2-Zellen sowie der IgG4- und IgE-Produktion und Induktion von ICAM-1 an TNF α -aktivierten Gefäßendothelien. IL-5, ebenso ein Th2-Zytokin, ist ein wichtiger Mediator für die Amplifikation und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Zu den Th2-Zytokinen gehört auch das IL-9, das unterschiedliche Zelltypen wie T- und B-Zellen, Mastzellen und Eosinophile aktivieren kann und wahrscheinlich an der Entstehung und Persistenz allergischer und asthmatischer Erkrankungen beteiligt ist [Dumoutier, Louahed et al. 2000]. Über die sekretierten Zytokine beeinflussen sich die beiden Th-Subpopulationen gegenseitig. So inhibiert das Th1-Zytokin IFN- γ die Proliferation von Th2-Zellen und das Th2-Zytokin IL-4 die Differenzierung von Th1-Zellen [Maggi E 1992]. Mehrere Interleukine wie IL-3, IL-6, IL-10 und TNF- α können sowohl von Th1- als auch von Th2-Zellen gebildet werden [Mosman TR 1996; Romagnani S 1997]. Zahlreiche physiologische wie auch pathologische Zustände des Organismus sind durch eine bestimmte immunologische T-Helfer-Antwort gekennzeichnet. Mykobakterien und kurz persistierende virale Pathogene wie Adenoviren

führen zu einer Th1-Antwort, wohingegen eine Th2-Antwort während der frühen Schwangerschaft, bei Parasitosen, lang persistierenden viralen Erkrankungen wie HIV und bei allergischen Erkrankungen zu finden ist [Del Prete 1995; Bennett WA 1997; Torres 2003].

B-Zellen binden auf ihrer Zelloberfläche Immunglobuline vom Typ IgM und IgD. Dieser Komplex, der maßgeblich an der Antigenerkennung beteiligt ist, wird als B-Zellrezeptor bezeichnet. Das unveränderte Allergen bindet an diesen Rezeptor und bei gleichzeitiger Stimulation durch die Th-Zelle und verschiedener Kostimulatoren kommt es zur Bildung von Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen. Entsprechend ihrer Zytokinklasse beeinflusst die Th-Zelle die Immunglobulinklasse.

Yoshimoto und Niess wiesen nach, dass IL-4, welches von Th2-Zellen gebildet wird, für den Wechsel von IgM zu IgE verantwortlich ist [Yoshimoto T 1995; Niess JH 2000]. Für diesen Klassenwechsel zum IgE wird unter anderem das Zwei-Signal-Modell postuliert [Worm and Henz 1997]. Das von Th2-Zellen sezernierte IL-4 bzw. IL-13 ist das erste Signal zum Klassenwechsel. IL-4 bindet an den IL-4-Rezeptor auf der Plasmazelle, was über mehrere Phosphorylierungsschritte durch Januskinasen (JAK 1 und 3) dazu führt, dass STAT6 (signal transducers and activators of transcription) ein Homodimer bildet und in den Kern gelangt, wo es an spezifische DNA-Sequenzen in der Promoterregion bindet und den Switch-Promotor von der c_ϵ -Region auf dem Chromosom 6 aktiviert. Das dabei entstehende Switch-Transkript richtet den Klassenwechsel auf die c_ϵ -Region [Bacharier, Jabara et al. 1998].

Das 2. Signal zur IgE-Produktion wird durch die CD40-CD40L-Interaktion vermittelt. CD40 ist ein 45 bis 50 kD Membran-Glykoprotein der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie. Es wird konstitutiv auf B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Der physiologische Ligand von CD40 ist CD40L, das auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird [Clark and Ledbetter 1994]. Diese Interaktion führt dann zur Produktion von IgE. Alle von dieser Plasmazelle sezernierten Immunglobuline gehören der Klasse IgE an [Heppt W 1998]. Um seine immunologische Wirkung entfalten zu können, bindet das IgE an IgE-Rezeptoren. Man unterscheidet mehrere Rezeptoren. Auf der Zelloberfläche von APC, Mastzellen und basophilen Granulozyten findet sich der hochaffine IgE-Rezeptor ($Fc_\epsilon RI$). Daneben gibt es niedrigaffine IgE-Rezeptoren (CD23) und IgE bindende Proteine (ϵ -BP), welche weit verbreitet sind und eine eher regulative Rolle in der IgE-Homöostase spielen [Gordon J; Bieber T 1992; Poulsen K 1995]. Bindet ein Allergen an diese zellgebundenen IgE-Proteine, kommt es zur Quervernetzung zwischen zwei benachbarten Fc_ϵ -Rezeptoren und damit zur Aktivierung von Mastzellen (Initiierungsphase) [Kay 2001]. Die Folge ist die Freisetzung von Enzymen und verschiedenen Mediatoren wie Histamin, Zytokinen und Chemokinen in die

Umgebung. Klinisch zeigt sich dies in Form von Rötungen, Ödemen, Juckreiz und Konstriktion der glatten Muskulatur. Die Mediatoren und Enzyme aus den Mastzellen können andere Zellen und das Komplementsystem aktivieren (Propagationsphase). Die Folge ist die Einwanderung von neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Th2-Zellen [Kay 2001]. Die gezielte Einwanderung dieser Zellen wird durch Chemokine reguliert [Elsner and Kapp 2001]. In der Frühphase (6 Stunden nach allergener Provokation) findet sich ein hoher Spiegel des Chemokins Eotaxin, nach 24 Stunden steigen die Chemokine RANTES und MCP-4 an [Elsner and Kapp 2001]. Am Ort der Entzündung kommt es zur Degranulation der Granulozyten. Eosinophile Granulozyten setzen neben toxischen Produkten wie „Eosinophil Cationic Protein“ (ECP) und reaktiven Sauerstoffradikalen auch Mediatoren wie IL-5 und TGF- β frei, die die Entzündung weiter aufrechterhalten. Die Mediatoren können zu einer vermehrten Fibrosierung, Hypertrophie der glatten Muskulatur und einer gesteigerten Schleimproduktion in der Bronchialschleimhaut führen [Elsner 2002].

Bei der allergischen Sofortreaktion kommt es zu einer schnellen Entwicklung der Symptomatik. Bei erstmaligem Kontakt mit dem potentiellen Allergen wird dieses als fremd erkannt und es kommt zur oben beschriebenen Kaskade der Sensibilisierung.

Sowohl auf der Stufe der T- als auch der B-Zellen bleiben Gedächtniszellen zurück, die bei erneuter Exposition schneller und auch bei fehlender Kostimulation durch Zytokine aktiviert werden. Bei wiederholtem Allergenkontakt oder unspezifischen Reizen wie Kälte oder Anstrengung schütten die Mastzellen in der sogenannten Effektorphase mit dem membran- gebundenen IgE ihre präformierten Hormone und Enzyme aus [Kay 2001]. Wie vielfach in der Literatur beschrieben, weist die Prägung des Immunsystems gegenüber dem Allergen ein Überwiegen der Th2-Zellen auf [Wierenga, Snoek et al. 1990; Parronchi, Macchia et al. 1991].

1.3 Allergene

Es handelt sich hierbei meist um Polypeptide oder Proteine mit einem Molekulargewicht von 5 bis 50 kDa. Für die Potenz entscheidend sind bestimmte Epitopmuster und deren ständige Wiederholung, Löslichkeit, Fremdheitsgrad und Konzentration.

In der Immunologie ist ein Soforttypallergen definitionsgemäß ein Antigen, das in der Lage ist, eine Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern zu induzieren. Weiterhin muß ein Allergen eine Histaminfreisetzung durch Vernetzung von Fc ϵ R-gebundenem IgE auf basophilen Granulozyten oder Mastzellen hervorrufen können. Allergene, die die Fähigkeit besitzen, bei prädisponierten Personen Reaktionen mit einer massiven Bildung von

spezifischen IgE-Antikörpern auszulösen, werden atopische Allergene genannt. Bei Exposition kommt es zur Auslösung von Reaktionen des Soforttyps. Die Sensibilisierung erfolgt verschiedenartig. Der Hauptweg ist jedoch inhalativ.

Im Hinblick auf die Potenz hat sich die Unterscheidung in Major- und Minorallergene bewährt. Reagieren mehr als 50% der getesteten sensibilisierten Patienten mit dem entsprechenden spezifischen IgE, so bezeichnet man dieses Allergen als Majorallergen [Lowenstein 1980]. Durch das Vorhandensein gleicher Strukturbereiche (Epitope) verschiedener Proteine erklären sich häufig auftretende Kreuzreaktionen verschiedener Allergene. Darunter versteht man die Tatsache, dass die Allergie sich nicht nur gegen ein einzelnes, sondern gegen eine ganze Reihe von Allergenen richten kann. So reagieren beispielsweise Patienten mit einer Birkenallergie häufig auch auf Kontakt mit Kirschen, Äpfeln, Haselnüssen, oder Kiwis. Gräserallergiker reagieren gehäuft auch auf Roggenmehl, Tomaten, Kartoffeln und Erdnüsse. Der Begriff Isoallergen bezeichnet Allergene verschiedener Spezies, die aus ähnlichen oder gleichen Molekülen (gleiche Molekülgröße, mindestens 67% Identität in der Aminosäuresequenz und gleiche biologische Funktion) bestehen. Allergene werden aufgrund ihrer Vielfalt nach der WHO-Nomenklatur eingeteilt [WHO/IUS 1995].

Es wird noch weitgehend mit natürlichen Gesamtextrakten der Allergene getestet und therapiert. Dabei differieren Extrakte mit nativen Allergenen von chemisch modifizierten Extrakten (Allergoide) [Kleine-Tebbe 2003]. Einzelallergene lassen sich auch rekombinant herstellen. Dazu wird mRNA aus der gewünschten Allergenquelle isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wird die doppelsträngige cDNA in Vektoren einkloniert und durch Transfektion in Bakterien (meist *E. coli*) eingeschleust. Die Bakterien können durch spezielle Promotoren veranlaßt werden, hohe Konzentrationen der Proteine der eingeschleusten Fremd-DNA zu produzieren [Baldo 1991].

1.4 Epidemiologie

Nach epidemiologischen Untersuchungen leiden 10 bis 30% der Bevölkerung in Industriestaaten an allergischen Beschwerden. Die Häufigkeit von kindlichem Asthma variiert zwischen verschiedenen Populationen weltweit von weniger als 2% bis 30%. Die höchsten Prävalenzzahlen kommen aus Großbritannien, Neuseeland und Australien, die niedrigsten aus Osteuropa, China und Indonesien [ISAAC 1998]. In den letzten Jahren nahm die Zahl allergischer Erkrankungen, insbesondere des Respirationstraktes, der Konjunktiven und der

Haut trotz verbesserter Therapie und frühzeitiger Diagnose ständig zu [Lowenstein 1995; Nimmagadda SR 1999]. Die durchschnittliche Prävalenz für eine Rhinitis allergica liegt zur Zeit bei 10 bis 15%, für eine Dermatitis atopica bei 5 bis 10% und für ein allergisches Asthma bronchiale bei 10 bis 15% [ISAAC 1998]. Innerhalb Europas existiert ein Ost/West-Gefälle. Bjorksten et al zeigten, dass die Prävalenz von asthmatischen Beschwerden bei 13 bis 14 jährigen Kindern in Finnland und Schweden bei 11,2 bis 19,7%, in Estland, Litauen und Polen bei 7,6 bis 8,5% und in Albanien, Rumänien, Rußland, Georgien und Usbekistan bei 2,6 bis 5,9% liegt. Ähnliche regionale Unterschiede fanden sich auch für Beugedermatitis und juckende Augen [Bjorksten B 1998]. Im Vergleich zwischen Ost- und Westdeutschland vor der Wende war die Prävalenz des Heuschnupfens und des Asthmas bei 9 bis 11 Jahre alten Kindern aus dem Westen signifikant höher als in Ostdeutschland [von Mutius, Martinez et al. 1994]. Nach der Vereinigung kam es in den neuen Bundesländern zu einem Anstieg der Prävalenz von Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung, allerdings nicht des Asthma bronchiale [von Mutius, Weiland et al. 1998]. Braun-Fahrlander zeigte in einer Schweizer Population, dass Bauernkinder, obwohl in der gleichen Region lebend, eine signifikant geringere Häufigkeit für Pollinosesymptome während der Pollensaison aufwiesen und eine geringere Häufigkeit atopischer Sensibilisierung als Nicht-Bauernkinder [Braun-Fahrlander, Gassner et al. 1999]. Auch im Vergleich zwischen Schweden, Estland und Polen wurde eine deutlich höhere Prävalenz der atopischen Sensibilisierung bei Kindern im Alter von 10 bis 12 Jahren in Schweden gefunden [Braback, Breborowicz et al. 1995]. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Studien aus Deutschland, Finnland und Kanada [Ernst and Cormier 2000; Kilpelainen, Terho et al. 2000; Von Ehrenstein, Von Mutius et al. 2000]. Die Bevölkerung von Industriestaaten ist häufiger betroffen, als die von Entwicklungsländern.

Auf der Suche nach den Ursachen für Allergien, den regionalen Unterschieden und der allgemeinen Zunahme der Erkrankungen finden sich viele Hypothesen in zahlreichen Studien. So haben Kopplungsanalysen verschiedene Genlokalisierungen nachgewiesen, die eine Assoziation mit allergischen Erkrankungen aufweisen. Bestimmte chromosomale Regionen sind für spezifische Immunglobuline, Rezeptor- und Transmitterproteine verantwortlich. Auf den langen Armen der Chromosomen 5, 11 und 14 sowie auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 sind für die Allergie als wichtig erkannte Chromosomenabschnitte nachgewiesen worden [Cookson WOCM 1989; Marsh DG 1994].

Anhand von Familienuntersuchungen konnte ein erblicher Einfluß auf die Ausbildung von Atopien festgestellt werden. In den ersten 7 Lebensjahren einen Krankheitsausbruch zu erleiden liegt bei negativer Familienanamnese bei 10%, wenn ein Elternteil betroffen ist bei

20%, wenn beide Elternteile Allergien haben bei 42%, und bei 75%, wenn beide Elternteile dieselbe Manifestation haben [Kjellman 1977].

Weiterhin können Infektionskrankheiten die Entstehung und Entwicklung von Allergien unterschiedlich beeinflussen. Kinder werden mit einer physiologischen Th2-balancierten Immunantwort geboren, die sich in den ersten Lebensmonaten, mit hoher Wahrscheinlichkeit unter dem Einfluß der mikrobiellen Belastung in Richtung eines Th1-dominierten T-Zell-Gleichgewichtes verschiebt. Es finden sich Hinweise, dass die Aktivierung von T-regulatorischen Zellen (Tr1), welche vor allem durch IL-10 und IFN- γ induziert werden und ihrerseits IL-10 und IFN- γ produzieren, zur Inhibition einer überschießenden allergischen Immunantwort beitragen kann [Levings, Sangregorio et al. 2001]. Eine anhaltende Spätreaktion gegen Tuberkelbakterien geht mit weniger Gesamt-IgE und geringerer spezifischer Sensibilisierung einher [Cookson and Moffatt 1997; Shirakawa, Enomoto et al. 1997]. Erwachsene mit Hepatitis-A-Infektion zeigen eine reduzierte Allergiehäufigkeit [Matricardi 1997]. Virusinfektionen im Säuglingsalter sind mit weniger Allergien im späteren Alter assoziiert [Illi, von Mutius et al. 2001]. Der Schutz vor einer Allergieentstehung steigt mit der Lipopolysaccharid-(LPS)-Konzentration im Staub und geht immunologisch mit Zeichen einer LPS-Toleranz einher [Braun-Fahrlander, Riedler et al. 2002]. Daneben wird vermutet, dass Allergien aber auch durch Infektionen ausgelöst werden können. In einer Fallkontrollstudie zeigte sich eine Koinzidenz zwischen einer schweren Respiratory-Syncytial-Virus-(RSV) Bronchiolitis im Säuglingsalter und einer häufigeren Sensibilisierung dieser Kinder in den folgenden Lebensjahren [Peebles 2004].

Herz et al. führten Studien an Mäusen durch, die während ihrer Schwangerschaft mit Ovalbumin sensibilisiert wurden. Der Nachwuchs zeigte erniedrigte IFN- γ Werte im Sinne einer unterdrückten Th1-Antwort. Die Bereitschaft des Nachwuchses zur Sensibilisierung war deutlich erhöht [Uthoff, Spenner et al. 2003].

Es finden sich in zunehmendem Maße schädliche Stoffe in der Umwelt, die das Gleichgewicht stören und zu einer ernsthaften Gefahr für Mensch, Tier und Pflanzen werden. Neue Erkenntnisse haben gezeigt, dass Stoffgemische, die an sich keine allergenen Eigenschaften besitzen, dennoch die Entstehung von Allergien fördern (Adjuvanseffekte) oder zur Chronifizierung allergischer Erkrankungen beitragen können. Dazu gehören Schwefeldioxid, atmosphärische Schwebstäube und Dieselrußpartikel [Ring, Fuchs et al. 2000]. Darüber hinaus können bestimmte Schadstoffe bei allergisch erkrankten Menschen die Intensität der Beschwerden erheblich verstärken [Behrendt, Becker et al. 1997]. Mit der „Hygiene-Hypothese“ werden die allgemeine Reduktion der Infektionshäufigkeit im

Säuglingsalter und die Veränderung der gastrointestinalen Flora für die Zunahme allergischer Erkrankungen verantwortlich gemacht, d.h. eine niedrige mikrobielle Belastung führt zum verstärkten Auftreten von Allergien [Cardoso, Cousens et al. 2004].

Insgesamt scheint es sich bei der Entstehung von Allergien um ein komplexes Netzwerk von vielen verschiedenen Faktoren zu handeln [Kaiser 2004]. Die einzelnen Ursachen (z.B. genetische Prädisposition, höhere Schadstoffbelastung, Veränderungen in der Lebensweise, mütterliches Rauchen, geographische Unterschiede, Hygienehypothese) müssen wohl in ihrer Gesamtheit betrachtet werden, um die Allergie und deren Zunahme erklären zu können.

1.5 Diagnostik

Am Anfang jeder Diagnostik steht die Anamnese. Sie dient dazu, die individuelle Prägung zu erfahren, die Expositionssituation zu erkennen und Informationen über Schwere und Verlauf der Erkrankung zu bekommen. Dabei können Fragebogen-gestützte Anamnese oder ein Patiententagebuch hilfreich sein.

Manche Allergien lassen sich ohne komplizierte Hilfsmittel diagnostizieren. Dies gilt vor allem dann, wenn Symptome direkt nach dem Kontakt mit dem Allergen auftreten. In vielen Fällen ist die Diagnosestellung aber weniger leicht, wenn Beschwerden zum Beispiel erst mehrere Stunden nach Allergenkontakt auftreten, der Kontakt nur unregelmäßig Probleme hervorruft, oder aber mehrere Allergien gleichzeitig vorliegen. Es gibt verschiedene Verfahren zur Feststellung des spezifischen Allergens. Dabei werden Hauttestungen und In-vitro-Analysen herangezogen. Eine atopische Erkrankung zu diagnostizieren erfordert häufig eine Kombination aus Anamnese, Provokationstests (Skin-Prick-Test), Serumanalysen (RAST) und Laboruntersuchungen (IgE-Spiegel, Eosinophilenanzahl). Am häufigsten angewendet wird der Skin-Prick-Test. Er wird meistens auf dem Rücken oder Unterarm durchgeführt. Das Ergebnis kann nach 15 bis 20 Minuten direkt abgelesen werden. Bei richtiger Anwendung hat dieser Test gegenüber der IgE-Spiegel Bestimmung und dem Phadiatop-Test den besten positiven Vorhersagewert und die höchste Effizienz, um atopische respiratorische Erkrankungen zu diagnostizieren. Bei anzunehmenden systemischen Reaktionen kann auch ein Reibetest durchgeführt werden.

Die Messung der IgE-Spiegel (gesamt oder spezifisch) stellt besonders bei Kleinkindern mit stark ekzematös veränderter Haut und Urtikaria eine Alternative in der Diagnostik dar. Antihistaminika brauchen hier im Gegensatz zum Skin-Prick-Test nicht vorher abgesetzt zu werden. Die Höhe des IgE Wertes wird meist in 4 bis 6 Klassen unterteilt. Ergebnisse der

Klasse 2 und größer werden als klinisch signifikant, Klasse 1 als grenzwertig oder negativ und Klasse 0 als negativ interpretiert [Sanz ML 1996]. Daneben gibt es Multitest-Systeme, bei denen eine Mischung der üblichen Allergene auf einen Träger gebunden ist, Basophile-Degranulations-tests (BDT), Celluläre Allergen-Stimulationstests (CAST) und gekreuzte Immunelektrophoresen (CIE).

1.6 Therapie allergischer Erkrankungen

Wie bei vielen anderen Erkrankungen auch unterscheidet man Prävention, symptomatische Behandlung und kausale Therapien.

1.6.1 Prävention

Die Prävention zielt darauf ab, das tägliche Umfeld möglichst allergiearm zu gestalten. Dabei werden drei verschiedene Formen unterschieden. Primärprävention umfaßt die günstige Beeinflussung von Prozessen, die einer Krankheitsentstehung vorhergehen. Gesicherte Maßnahmen sind dabei das Vermeiden von Passivrauchen in den ersten Lebensjahren, das Vermeiden von Rauchen in der Schwangerschaft und Stillen über vier bis sechs Monate. Die Sekundärprävention meint die Verhinderung von Prozessen, die dazu führen, dass ein bereits sensibilisierter atopischer Patient klinisch erkrankt bzw. ein Patient, der bereits an allergischer Rhinokonjunktivitis oder atopischer Dermatitis leidet, Asthma entwickelt. Durch Vermeiden von Allergenkontakt (Allergenkarenz) können Symptome verhindert oder gemildert werden, wobei dies allerdings nicht immer umsetzbar ist [Reiss 1997]. Die Tertiärprävention zielt darauf ab, den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen bzw. Komplikationen zu vermeiden. Dazu gehören eine suffiziente Medikation, Asthaschulungen, spezifische Immuntherapie und Kuraufenthalte.

1.6.2 Symptomatische Therapie

Die Pharmakotherapie wird eingesetzt, wenn eine Allergenkarenz alleine nicht die gewünschte Besserung bringt oder ein schneller Wirkungseintritt erforderlich ist.

Entsprechend der klinischen Manifestierung liegen verschiedene Therapiepläne vor. Mit zunehmender Ausprägung der Symptomatik wird die Art, Menge und Darreichungsform der verwendeten Pharmaka angepaßt. Als Beispiel sei hier der Stufenplan der Asthmathherapie erwähnt.

Zu den wichtigsten Vertretern gehören H₁-Antihistaminika, die bei Patienten mit allergischer Rhinitis häufig als erste Behandlungsmaßnahme eingesetzt werden und gut wirksam in der

Symptomlinderung bei Niesen, Juckreiz und wässriger Rhinorrhoe sind [White, Slater et al. 1987; Trigg and Davies 1996]. Im Gegensatz zu den Antihistaminika der 1. Generation haben die H₁-selektiven-Histamin-Rezeptor-Antagonisten nur geringe Nebenwirkungen. Darüber hinaus besitzen Antihistaminika zusätzlich zu ihrer antagonistischen Wirkung auf den Histaminrezeptor antiinflammatorische Fähigkeiten [Taytard, Beaumont et al. 1987; De Vos, Joseph et al. 1989; Nabe, Agrawal et al. 1989].

Topisch angewandte Glukokortikoide stellen die bevorzugte Behandlungsweise der allergischen Rhinitis dar. Sie können die Expression und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine herabsetzen und sind effektiv in der Reduzierung der allergisch verursachten nasalen Hyperreagabilität bei der Rhinitis [Baroody, Rouadi et al. 1998]. Zusätzlich reduzieren sie die Anzahl der Langerhans- und Mastzellen, IL-4 immunreaktiven Zellen und Th2-Zellen [Holm, Fokkens et al. 1995; Juliusson, Aldenborg et al. 1995]. Steroide führen zu einer Abnahme der Dichte der Mukosa-Mastzellen und eosinophilen Granulozyten im Epithel, was zu einer Abnahme der Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren führt.

Mastzellstabilisatoren haben wie der Name sagt, eine mastzellstabilisierende Wirkung und werden bei der intermittierenden als auch persistierenden Rhinitis angewendet [Druce, Goldstein et al. 1990; Orgel, Meltzer et al. 1991]. Besonders effektiv wirken sie bei Kindern. Als abschwellende Nasentropfen oder –sprays werden α-Sympathomimetika eingesetzt. Sie bekämpfen die nasale Obstruktion und Rhinorrhoe bei allergischer Rhinitis.

Das Anticholinergikum Ipratropiumbromid eignet sich zur Behandlung einer Rhinorrhoe, pulmonaler Hypersekretion und Obstruktion. Es wird in Form von Sprays topisch angewendet.

Leukotriene sind wichtige Produkte des 5-Lipoxygenase-Syntheseweges im Arachidonsäurestoffwechsel. Diese inflammatorischen Mediatoren werden beim Asthma bronchiale von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen vermehrt freigesetzt. Es kommt zu einer Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, zu einer Zunahme der Gefäßpermeabilität und einer vermehrten Auswanderung eosinophiler Granulozyten ins Gewebe. Leukotriene sind sowohl an der allergischen Früh- als auch Spätreaktion beteiligt. In Deutschland ist derzeit nur Montelukast als Vertreter der Leukotrienrezeptorantagonisten zur Therapie zugelassen. Wie Studien zeigten, vermittelt die Substanz effektiven Schutz vor Bronchokonstriktion und setzt die Nitritoxidspiegel in der Ausatemluft von Kindern mit Asthma herab. Weiterhin kann damit eine signifikante Reduktion der peripheren Eosinophilie erreicht werden [Jarvis and Markham 2000; Muijsers and Noble 2002; Nayak 2004].

1.6.3 Spezifische Immuntherapie

In der Behandlung allergischer Erkrankungen spielt die spezifische Immuntherapie (SIT, Synonyma: Hyposensibilisierung, Desensibilisierung) als derzeit einzige kausale Methode der Behandlung eine zentrale Rolle [Kägi M. K. 2002].

Unter einer spezifischen Immuntherapie im Sinne einer Hyposensibilisierung versteht man eine Behandlungsmethode, bei der durch wiederholte Gabe eines relevanten Allergens die klinische Verträglichkeit dieses Allergens induziert werden soll. Durch die Exposition der Erkrankten gegenüber ansteigenden Dosen der relevanten Allergene wurden im Jahre 1911 durch Noon und Freeman erstmals Allergiker behandelt [Freeman 1911; Noon 1911]. Im Gegensatz zu den symptomatischen Therapien stellt sie eine Behandlung dar, die den natürlichen Verlauf allergischer Erkrankungen beeinflussen, den Ausbruch von Asthma und die Sensibilisierung auf weitere Allergene verhindern kann [WHO-Position-Paper 1998; Pajno, Barberio et al. 2001; Purello-D'Ambrosio, Gangemi et al. 2001]. Die wichtigsten Indikationen für eine spezifische Immuntherapie sind durch Pollen-, Hausstaubmilben-, Tierhaar- und bestimmte Schimmel-pilzallergene ausgelöste Rhinokonjunktivitiden und das allergische Asthma sowie Allergien auf Hymenopterengifte. Diese nun seit vielen Jahren durchgeführte und allgemein anerkannte Therapieform konnte in den letzten Jahren zum Beispiel durch die Standardisierung der Allergene erheblich verbessert werden. Zahlreiche kontrollierte Studien belegen, dass die spezifische Immuntherapie bei adäquater Allergenzusammensetzung sowie korrekter Therapieausführung ein wirksames und ökonomisch sinnvolles Element der antiallergischen Behandlung darstellt [Wahn U 1988; Varney VA 1991; Greenberger 1992; Des Roches A 1997; Malling 1998; Abramson, Puy et al. 1999; Ross, Nelson et al. 2000].

Die Wirkungsweise der SIT ist nach wie vor nur ansatzweise bekannt. Es gibt Hinweise, dass die Veränderungen durch einen Effekt der Immuntherapie auf T-Zellen mit einer Alteration von einer prädominanten Th2-Antwort (hervorgerufen durch IL-4 und IL-5) zu einer bevorzugten Th1-Antwort (IFN- γ induziert) hervorgerufen werden [Durham, Walker et al. 1999]. Antigenspezifische T-Zellen gelten bei der subkutanen Form der SIT als Zielzellen. Th2-Zellen induzieren mit Hilfe der Interleukine -4 und -13 die IgE-Synthese und durch ihre IL-5-Produktion die von eosinophilen Granulozyten geprägte allergische Entzündung. Die SIT hemmt die Funktion der Th2-Zellen durch vermehrte Ausschüttung der immunsuppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 aus regulatorischen Th1-Zellen [Bellinghausen, Metz et al. 1997].

Daneben wird eine gegenregulatorische Th1-Immunantwort induziert: IL-12 aus APC stimuliert die IFN- γ -Produktion der Th1-Zellen und hemmt dadurch die lokale IgE-Bildung und die Differenzierung von Th2-Zellen [Akdis and Blaser 2000]. Die Beteiligung von eosinophilen und basophilen Granulozyten an der allergischen Entzündung wird gebremst [Pierkes, Bellinghausen et al. 1999; Wilson, Irani et al. 2001].

Es kommt zu einer Reduktion der Mastzellen und mastzell-assoziierten Mediatoren [Creticos, Adkinson et al. 1985; Otsuka, Mezawa et al. 1991] und die Allergen induzierte T-Zell-Antwort wird mit Zunahme der Anzahl der zirkulierenden allergenspezifischen CD8⁺ T-Zellen supprimiert [Rocklin, Sheffer et al. 1980].

Lokale Immuntherapien

Die „lokale Immuntherapie“ beinhaltet alle nicht subkutanen Formen der SIT. Dazu gehören nasale, bronchiale, orale und sublinguale Darreichungen des Allergenextraktes.

Schon Dakin berichtete 1826 über nordamerikanische Indianer, die regelmäßig kleine Mengen der Blätter der Pflanze Giftsumach (Poison ivy) zerkauten, um die schweren Dermatitis, die nach Kontakt mit dieser Pflanze auftraten, zu vermeiden oder abzuschwächen [Tomasi 1980].

Es gibt experimentelle Beweise, dass die lokale Gabe von Allergenextrakten an Schleimhäuten zu einer lokalen Induktion einer Mukosatoleranz führt. In Tierstudien konnte diese Toleranz durch orale Aufnahme von Antigenextrakten erzeugt werden [Friedman and Weiner 1994; Chen, Inobe et al. 1995].

Die sublinguale Immuntherapie (SLIT)

Die sublinguale Immuntherapie (SLIT) ist seit mehreren Jahren besonders in europäischen Ländern weit verbreitet. Das Interesse an Immuntherapien, die nicht injiziert werden müssen ist groß. Die seltenen aber möglichen schweren Nebenwirkungen, die Invasivität, die viele Patienten, besonders Kinder zum Teil schlecht tolerieren und das häufige Aufsuchen eines Arztes für die Gabe sind Nachteile der subkutanen Immuntherapie.

Die SLIT zeigt nach bisher veröffentlichten Studien klinische Wirksamkeit bei der allergischen Rhinitis und Asthma, das durch Hausstaubmilben, Pollen und Schimmelpilze hervorgerufen wird [Tari, Mancino et al. 1990; Bousquet, Scheinmann et al. 1999; Mungan, Misirligil et al. 1999; Guez, Vatrinet et al. 2000; Pajno, Morabito et al. 2000; Bahceciler, Isik et al. 2001]. Solche Studien beinhalten unter anderem Graspollen [Sabbah, Hassoun et al. 1994; Clavel, Bousquet et al. 1998; Hordijk, Antvelink et al. 1998; Di Rienzo, Puccinelli et al.

1999; Fanta, Bohle et al. 1999; Pradalier, Basset et al. 1999], Parietaria [Troise, Voltolini et al. 1995; Ariano, Panzani et al. 1998; Passalacqua, Albano et al. 1999], Ragweed [Van Deusen, Angelini et al. 1997] und Baumpollen [Horak, Stubner et al. 1998; Vourdas, Syrigou et al. 1998]. Sie ist sowohl für Kinder [Tari, Mancino et al. 1990; Giovane, Bardare et al. 1994; Di Rienzo, Puccinelli et al. 1999] als auch Erwachsene wirksam. Darüber hinaus kann eine solche Immuntherapie bei Patienten mit einigen Lebensmittelallergien angewandt werden, um eine Toleranz gegenüber spezifischen Nahrungsmitteln zu entwickeln [Patriarca, Schiavino et al. 1998; Nucera, Schiavino et al. 2000].

Trotz der großen Anzahl der Studien und dem Nachweis der guten Wirksamkeit und geringen Nebenwirkungsrate (in mehr als 15 Jahren gab es keinen Bericht über schwere, systemische Nebenwirkungen) gibt es weiterhin Vorbehalte über die Anwendung der SLIT.

Es gibt Unsicherheiten bei der Wahl der optimalen Dosis, die in den publizierten Studien 5 bis mehrere 100fach höher dosiert als bei der SCIT ist [Morris, Kroker et al. 2003]. Weiterhin findet sich für die sublinguale Darreichungsform kein definiertes Dosis-Wirkungs-Verhältnis. Die Selbstverabreichung der Tropfen kann zu Problemen in der Compliance der Patienten führen und es bedarf weiterer Klärung der Wirkungsweise, der angemessenen Dauer der Therapie und des damit verbundenen Erfolges sowie der Vergleichbarkeit mit der SCIT, insbesondere auch im Hinblick auf die präventive Wirkung [Kleine-Tebbe 2003].

Die Mechanismen der SLIT sind nach wie vor nicht geklärt, aber es liegen bereits einige Untersuchungen hierzu vor. Vereinzelt finden sich höhere Serum-IgG4/IgE-Quotienten bei Patienten unter SLIT [Lima, Wilson et al. 2002]. Über sonstige immunologische Marker ist kaum etwas bekannt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Allergen bis zu 20 Stunden nach der Gabe in der Mukosa bleibt [Bagnasco, Mariani et al. 1997]. Nach der Gabe von radiomarkierten Iod (I123)-Allergen bei erwachsenen Volontären zeigte sich keine direkte Absorption des Allergens durch die Mukosa. Die Plasmaradioaktivität stieg erst nach Schlucken des Allergens an [Bagnasco, Mariani et al. 1997], wobei es eine lange Zeit in der oralen Mukosa verblieb. Ein möglicher Mechanismus ist, dass das sublingual applizierte Allergen über eine Prozessierung in APC oder Epithelzellen in der Mukosa zu einer Toleranz gegen dieses Allergen führt (**Mukosatoleranz**) [Brown and Frew 2001; Wiedermann 2003]. APC in der oralen Mukosa weisen eine starke MHC II-Expression auf. Die Prozessierung der Allergene in den APC führt zu einer Aktivierung von T-Zellen. Weiterhin produzieren dendritische Zellen IL-12, welches zu einer Th1-Antwort führt [Ebner, Ratzinger et al. 2001]. Weiterhin zeigten Studien, dass die Permeabilität der Mukosa gegenüber Makromolekülen bei Allergikern höher

als bei Gesunden ist [Buckle and Cohen 1975; Falagiani and Mistrello 1997]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das Allergen im lokalen oralen Immunsystem prozessiert wird [Bagnasco, Passalacqua et al. 2001]. Bieber et. al. zeigten, dass Langerhans-Zellen der oralen Mukosa nach Prozessierung und Präsentation von Allergenfragmenten Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) produzieren. IDO ist ein Tryptophan katabolisierendes Enzym mit regulatorischen Effekten auf T-Zellen. Tryptophan ist für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen essenziell; bei einem Abbau dieser Aminosäure durch IDO kommt es durch Tryptophanmangel zu einer Funktionshemmung und Apoptose der T-Zellen. Dies wird sowohl durch den Tryptophanabbau als auch durch die Anreicherung von Metaboliten erreicht [Kreuzkamp 2004; von Bubnoff, Fimmers et al. 2004]. Desweiteren scheint die Expressionsrate des hochaffinen IgE-Rezeptors $Fc_\epsilon RI$ auf diesen Langerhans-Zellen bei Atopikern viel höher zu sein, was immunregulatorisch von Bedeutung sein kann [Novak, Valenta et al. 2004].

Antigenpräsentation kann entweder zur Prägung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen oder zu einer funktionellen Inaktivierung und T-Zell-Toleranz führen. Das Aufdecken der Faktoren, die die Balance zwischen Toleranz und Immunantwort regulieren, ist von großer Bedeutung. Die Ursache von Allergien könnte unter anderem an einer fehlenden Toleranzinduktion oder einem Zusammenbruch derselben liegen. Man geht davon aus, dass die kritischen Faktoren in der Natur der Antigen Präsentierenden Zellen, der Anzahl der dendritischen Zellen, die einen Lymphknoten erreichen, ihrer Lebensspanne und kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen, die sie exprimieren, liegen [Sallusto and Lanzavecchia 1999; Dieli 2003].

Parameter zur Verlaufskontrolle der SIT

Allgemeine klinische Verlaufsparemeter können sehr deutlich bei einer allergischen Erkrankung das Ansprechen auf die Therapie und den damit verbundenen Erfolg verdeutlichen. Dies sind unter anderem das Auftreten von Symptomen und der damit verbundene Medikamentenverbrauch, die Bestimmung des maximal expiratorischen Flusses (EFP) mittels Spirometrie, Skin-Prick-Tests und andere Provokationstests, das Auftreten neuer Sensibilisierungen auf andere Allergene sowie ein Etagenwechsel.

Die Bedeutung und Aussagekraft immunologischer Parameter wird relativ kontrovers diskutiert. Zu den etablierteren Markern zählt vor allem das IgE, neuerdings werden auch IgG, insbesondere IgG4 oder der IgG4/IgE-Quotient herangezogen. Ein genaues zu

erwartendes Verlaufsprofil läßt aber die aktuelle Studienlage nicht zu. Da es aber auch bei der subkutanen Immuntherapie bisher keine individuelle Korrelation zwischen immunologischen Veränderungen und klinischer Wirkung gibt, können Veränderungen der immunologischen Parameter ein Hinweis für eine immunologische Reaktion, aber nicht zwangsläufig auch für die klinische Wirkung sein [Wessner, Rakoski et al. 2003].

Weitere Parameter befinden sich in der experimentellen Erprobung, um sowohl den Wirkmechanismus der Therapie aufzuklären, aber auch um eine immunologische Wirkung zu demonstrieren, die wiederum als Spiegel der klinischen Symptomatik dienen soll.

Dazu gehören Zytokine wie IL-4, IFN- γ und IL-10 die eine Änderung des Th1/Th2-Verhältnisses aufdecken können. Deren Expression sollte in dieser Arbeit analysiert werden.

1.6.4 Weitere Therapieansätze

In den vergangenen Jahren wurden monoklonale Anti-IgE-Antikörper entwickelt. Dieser Antikörper bindet nur an frei zirkulierendes IgE. Inzwischen liegen eine Reihe von Phase-III-Studien vor, welche die Sicherheit und Effektivität in der Behandlung des allergischen Asthma bronchiale und der allergischen Rhinitis belegen. Nach bisherigem Wissenstand hält der prophylaktische Effekt aber nur solange an, wie die Substanz zugeführt wird. Langzeiterfahrungen fehlen [Milgrom, Berger et al. 2001; Soler, Matz et al. 2001]. IgE bindende Haptene von Hauptallergenen könnten eingesetzt werden, um mastzellgebundenes IgE vor dem Allergenkontakt zu sättigen und so zum Beispiel anaphylaktische Reaktionen zu reduzieren. Als passive Therapie könnten Allergen-spezifische Antikörper und Antikörperfragmente dienen. Die Entwicklung von nicht-anaphylaktischen Allergenen, Allergenfragmenten oder Peptiden zur aktiven Immuntherapie stellt eine weitere Möglichkeit zur Behandlung dar [WHO-Position-Paper 1998]. Die Immunisierung mit Plasmid-DNA, die für bestimmte Allergene kodiert, kann zu einer gesteigerten Th1-Antwort führen [Raz, Tighe et al. 1996].

Daneben werden bereits Adjuvansien wie das MPL[®] eingesetzt, die durch Stimulation des Th1-Systems unterstützend während einer SIT wirken sollen [Wheeler, Marshall et al. 2001; Drachenberg, Heinzkill et al. 2003].

2. Ziele der Arbeit

Die genauen Wirkmechanismen spezifischer Immuntherapien sind nach wie vor nicht geklärt. Insgesamt handelt es sich um ein Netzwerk immunologischer Interaktionen zwischen Zytokinen, Zelloberflächenmolekülen und kostimulatorischen Faktoren.

In dieser Arbeit sollten immunologische Parameter zur Beurteilung der Wirkung der sublingualen Immuntherapie (SLIT) auf das Immunsystem über 2 bis 3 Jahre verglichen werden. Die gemessenen Daten wurden mit den Daten aus der Dissertation von Dr. med. Claudia Bär verglichen, die als Ausgangswerte der selben Patienten vor Therapiebeginn herangezogen wurden [Bär 2001].

Eine Verschiebung des Interleukin-Gleichgewichtes in Richtung Th2 bei Allergikern wird als wichtiges Glied im Pathomechanismus der Allergie angesehen.

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob das verschobene Interleukin-Profil unter Immuntherapie korrigiert werden kann. Für diese Untersuchungen wurden IL-2 und IFN- γ als wichtigste Vertreter der Th1-Interleukine und IL-4 als Th2-Interleukin sowie IL-10 als regulatorisches Interleukin ausgewählt. IL-10 kann aufgrund seiner immunmodulatorischen Fähigkeiten zur Toleranzinduktion beitragen und übersteigerte Immunreaktionen unterdrücken. Diese Interleukine sollten intrazellulär in T- Lymphozyten der Patienten mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Des Weiteren sollte die Expression von CD154 gemessen werden. Die Interaktion des CD154-Moleküls (ehemals CD40-Ligand) auf T-Zellen mit dem CD40-Molekül auf B-Zellen stellt ein wichtiges Signal bei der Umwandlung von B-Zellen in IgE-exprimierende Zellen dar. Allergiker haben eine signifikant erhöhte CD154-Expression im Blut gegenüber gesunden Kontrollen.

Hierzu wurden die Lymphozyten kurzzeitig unspezifisch stimuliert. Da die Spontanproduktion von Interleukinen relativ gering ist und Interleukine nach ihrer Bildung schnell sezerniert werden, wurde gleichzeitig eine Sekretionshemmung durchgeführt, um messbare intrazelluläre Konzentrationen zu erhalten. Auf diese Weise sollte die generelle, also nicht allergen-spezifische Bereitschaft der Lymphozyten von Allergikern analysiert werden, auf einen Stimulus mit einer tendenziellen Th1- oder Th2- Antwort zu reagieren.

In die Untersuchungen sollten Patienten einbezogen werden, die unter einer zuvor untherapierten, isolierten Milben-, Gräser-, oder Birkenpollen-Allergie litten und durch eine spezifische sublinguale Immuntherapie behandelt wurden.

Folgende Arbeitshypothesen wurden aufgestellt und geprüft:

- 1.) Wir vermuten eine Suppression des CD154-Moleküls auf T-Zellen während der sublingualen Immuntherapie.
- 2.) Die Induzierbarkeit der Th1-Interleukine IL-2- und IFN- γ durch unspezifische Simulation steigt und des Th2-Interleukines IL-4 fällt unter spezifischer Immuntherapie, wodurch eine Verschiebung des Th1/Th2-Verhältnisses in Richtung Th1 bewirkt wird.
- 3.) Die Induzierbarkeit des regulatorischen Interleukins IL-10 steigt unter spezifischer Immuntherapie.
- 4.) Die genannten Parameter können dazu beitragen, immunologische Effekte an Patientenkohorten unter Immuntherapien bei Allergien zu analysieren.
- 5.) Sublinguale Immuntherapie führt zu einer Besserung der Symptomatik bei Allergikern.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenauswahl und Blutprobengewinnung

Die Blutproben stammen von Kindern aus der Ambulanz des Robert-Koch-Krankenhauses, Apolda, die dort aufgrund ihrer allergischen Erkrankung in Behandlung sind.

Für die Untersuchungen wurden pro Untersuchungszeitpunkt 5ml peripheres Venenblut abgenommen. Aus dem Blut der Patienten werden die Lymphozyten isoliert. Anschließend werden für die zytologischen Untersuchungen B-Zellen und T-Zellen separiert.

Insgesamt wurde Blut von 92 Kindern analysiert. 48 Kinder hatten Allergien gegen Gräserpollen, Birken- und Haselpollen oder Hausstaubmilben (20 Gräser, 7 Frühblüher, 21 Milben). Diese Patienten erhielten über 2 bis 3 Jahre eine sublinguale Immuntherapie (SLIT) und es wurden in regelmäßigen Abständen vor und während der Therapie Blutproben zur Analyse entnommen, so dass von diesen 48 Kindern 103 Analysen durchgeführt wurden. Somit konnte eine Verlaufsstudie mit gepaarten Stichproben angefertigt werden. 44 Blutproben wurden von gesunden Probanden untersucht.

Einschlußkriterium für die Patienten war eine einzige RAST-Klasse zwischen 3 und 6 sowie eine seit mindestens 2 Jahren bestehende Allergie nach entsprechender Diagnose. Alle Patienten erhielten eine Immuntherapie gegen nur eine Allergen-Spezifität. Patienten mit Mehrfachallergien wurden ausgeschlossen. Das Durchschnittsalter bei Therapiebeginn betrug 13 Jahre. Ein Einverständnis der Eltern zur Durchführung der Untersuchungen wurde eingeholt.

3.2 Dosierung, Art und Dauer der Anwendung von Pangramin SLIT®

Die Anwendungsgebiete der spezifischen Immuntherapie sind allergische Erkrankungen vom Soforttyp wie zum Beispiel Rhinitis allergica, Conjunctivitis allergica, Asthma bronchiale oder allergischer Schnupfen, deren Ursache nicht vermeidbare Allergene sind.

Die allergieauslösenden Stoffe (Allergene) werden in steigender Konzentration gegeben, wobei die Anfangsdosis sehr gering ist. Diese wird bis zum Erreichen der in der Regel für 3 bis 5 Jahre gegebenen Erhaltungsdosis kontinuierlich gesteigert.

Mögliche Kontraindikationen (wie aktive Tuberkulose, Erkrankungen der Leber, Niere und des Nervensystems, Autoimmunerkrankungen, Immundefekte, immunsuppressive

Behandlung, Tumorleiden, schwere chronisch entzündliche Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, irreversible Atemwegserkrankungen und Schwangerschaft) müssen vor Beginn der Therapie durch ein ausführliches Arzt-Patienten-Gespräch ausgeschlossen werden. Auch bei schnell einsetzender Symptombesserung muss der Patient über die Notwendigkeit der konsequenten Therapie über 3 Jahre hingewiesen werden. Regelmäßige Arztbesuche sind während der Therapie notwendig, um den Krankheitsverlauf genau zu verfolgen und die Begleitmedikation optimal zu gestalten.

Mit der SLIT kann jederzeit außerhalb der Pollensaison begonnen werden – spätestens jedoch 4 Wochen davor, da die Anfangsbehandlung vor Beginn des Pollenfluges abgeschlossen sein sollte, da während des Pollenfluges nicht gesteigert wird. Auch während der Pollensaison ist es im Interesse einer hohen kumulativen Dosis empfehlenswert, die Therapie unverändert fortzuführen. Von einer Dosissteigerung sollte in diesem Zeitraum jedoch abgesehen werden. Für den Fall, dass während der Pollenflugzeit starke allergische Symptome auftreten, ist eine Reduktion auf ein Fünftel der zuletzt genommenen Dosis anzuraten. Sollte sogar eine Unterbrechung der Behandlung erforderlich sein, so wird, in Abhängigkeit von der Dauer dieser, die Therapie gemäß der Dosierungsanleitung fortgesetzt.

Die 4 Wochen dauernde Anfangsbehandlung besteht bei diesem Präparat aus 4 verschiedenen Flaschen mit den Stärken 1 bis 4. Entsprechend des Behandlungsplanes wird die täglich zu nehmende Zahl der Tropfen gesteigert, bis die Enddosis von 10 Tropfen der Flasche 4 erreicht ist. Das nachfolgende Präparat „SLIT One“ hat eine verkürzte Vorlaufzeit mit 10 Tagen und dabei höhere Anfangsdosen, um die Phase der Dosissteigerung zu verkürzen.

Jetzt schließt sich die 3 bis 5 Jahre dauernde Fortsetzungsbehandlung mit der erreichten Erhaltungsdosis (im Normalfall 10 Tropfen der Flasche 4) bei einer vom Hersteller empfohlenen dreimaligen wöchentlichen Gabe an (s. Abb 3.1). In unserer Studie erhielten die Patienten täglich die Erhaltungsdosis. Wenn während der Anfangs- oder Fortsetzungsphase Unterbrechungen, Unverträglichkeiten, Impfungen oder Krankheiten auftreten, muß der allgemeine Behandlungsplan für den einzelnen Patienten modifiziert werden.

Nach der Einnahme, die möglichst immer zur selben Tageszeit erfolgen sollte, bleiben die Tropfen für 5 Minuten unter der Zunge und werden anschließend geschluckt. Bei Kindern ist es ratsam, die regelmäßige und richtige Gabe der Tropfen durch die Eltern überwachen zu lassen.

Eine sorgfältige Dokumentation über die Einnahmen ist durchzuführen. Bei korrekter Anwendung und Berücksichtigung des individuellen Sensibilisierungsgrades ist eine gute

Verträglichkeit gewährleistet. Typische harmlose Nebenwirkungen nach Einnahme sind Juckreiz im Mund- und Rachenraum, laut Herstellerangaben können selten auch milde Urtikaria sowie epigastrische Beschwerden, insbesondere bei hohen Allergendosen auftreten. Notwendige planbare Impfungen sollten frühestens eine Woche nach der letzten Pangramingabe erfolgen. Die Fortsetzung mit einer um 4 Stufen reduzierten Therapie erfolgt erst 2 Wochen nach der Schutzimpfung. Bei fieberhaften Impfungen während der Anfangsphase wird die Behandlung 2 Wochen danach erneut begonnen. Am Einnahmetag sind Alkohol und schwere Mahlzeiten zu meiden. Zur Zeit der Schwangerschaft darf keine SLIT durchgeführt oder begonnen werden. Während der Stillzeit ist eine Behandlung mit Pangramin SLIT[®] möglich.

Der Allergengehalt von Pangramin SLIT[®] ist biologisch standardisiert und wird in STU/ml (Spezifische Behandlungseinheiten) deklariert.

Flasche 1 (0,5 STU/ml Pollen-, Milben- oder Gräserallergen)

Flasche 2 (5 STU/ml Pollen-, Milben- oder Gräserallergen)

Flasche 3 (50 STU/ml Pollen-, Milben- oder Gräserallergen)

Flasche 4 (500 STU/ml Pollen-, Milben- oder Gräserallergen)

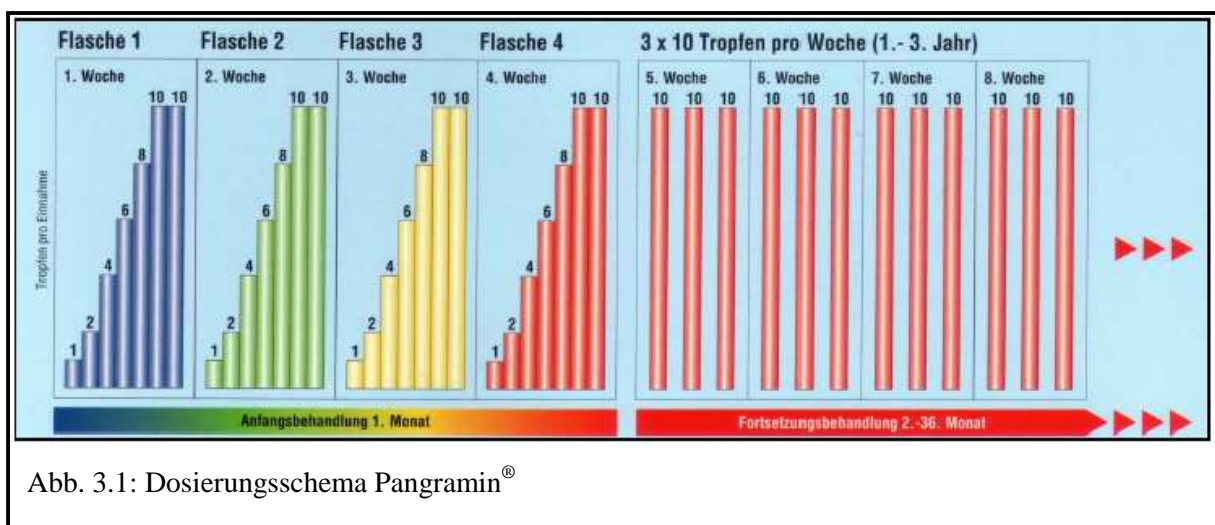


Abb. 3.1: Dosierungsschema Pangramin[®]

3.3 Arbeitsbedingungen

Alle Arbeiten werden bis nach der Zellseparation an einer sterilen Arbeitsbank mit laminarem Gegenstrom durchgeführt. Lösungen werden unter sterilen Bedingungen angesetzt, autoklaviert oder vor Gebrauch durch einen Filter mit 200 nm Porengröße steril filtriert.

3.4 Plasmaisolierung

Das heparinisierte Vollblut wird bei 2160U/min (886g) 10 Minuten zentrifugiert, das Plasma abpipettiert, in Reagenzgläser (15ml) gegeben und anschließend 30 Minuten bei 4000U/min (1780g) zentrifugiert. Das Plasma wird in Eppendorf-Tubes (jeweils 500µl) portioniert und bei - 70°C für spätere Untersuchungen eingefroren [Reich 2001].

3.5 Durchführung eines Ficoll-Dichtegradienten

Das entnommene Plasma wird durch RPMI 1640 ersetzt. Die zellulären Bestandteile werden resuspendiert. Anschließend werden 3ml Ficoll-Isopaque in Lymphozyten-Separationsröhrchen pipettiert und 30 Sekunden bei 2160U/min (886g) zentrifugiert, so dass sich der Ficoll-Isopaque (Lymphoprep) unterhalb der Filterscheibe befindet. Nun wird 1 zu 1 mit RPMI verdünntes Blut mit Hilfe einer Pasteurpipette in das Lymphozyten-Separationsröhrchen pipettiert, welches 15 Minuten bei 2160U/min (886g) zentrifugiert wird. Nach dem Zentrifugieren ergibt sich die in Abbildung 3.2 dargestellte Schichtung. Durch Abpipettieren werden die peripheren Blutlymphozyten

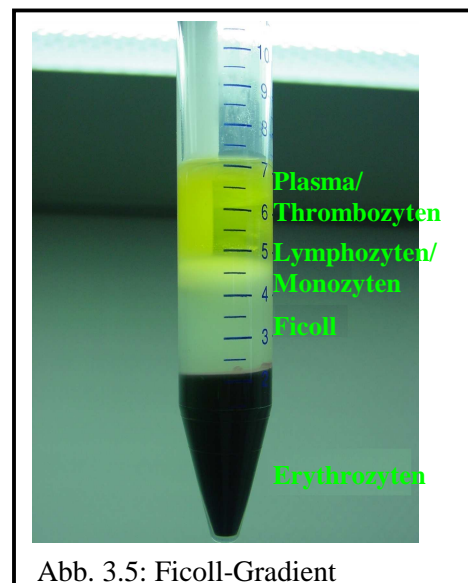


Abb. 3.5: Ficoll-Gradient

(PBL) direkt in ein Reagenzglas (15ml) transferiert, ohne eine Durchmischung mit den Erythrozyten zu erzeugen. Die PBL werden dreimal in 10 ml RPMI 1640 gewaschen, mit einer Pasteurpipette resuspendiert und jeweils 10 Minuten bei 2160U/min (886g) und Raumtemperatur zentrifugiert .

3.6 Separation der B- und T-Zellen mittels „Magnetic Activated Cell Sorter“ (MACS)

Um die T-Zellen von den peripheren Blutlymphozyten zu trennen wird eine Zellseparation mit Hilfe eines Magneten (MACS) durchgeführt.

Zunächst erfolgt eine Zählung in einer Neubauer-Zählkammer (1:20 Verdünnung mit 3% Essigsäure). Bei dieser Zellzählung werden 16 Kleinquadrate (Volumen der 16 Kleinquadrate 0,1µl) eines äußeren diagonalen Großquadrates gezählt. Die Summe dieser Kleinquadrate multipliziert mit 10^4 ergibt die Zellzahl pro 1ml. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 15µl anti-CD19 magnetischen Microbeads und 90µl PBS/FKS (10%) pro 1×10^8 Zellen/ml über 15 Minuten bei 4°C. Während der

Inkubationszeit wird die Separationssäule (Typ A2) vorbereitet und im Bereich des Magneten installiert (Abb. 3.6). Ca. 20ml 70% Alkohol werden in einer sterilen 20ml Injektionsspritze aufgezogen und mittels eines Dreiwegehahnes in die Säule gepresst, so dass die Luft aus dem Metallnetz der Säule entweichen kann. Der Alkohol bewirkt wegen seiner geringen Oberflächenspannung eine gute Benetzung

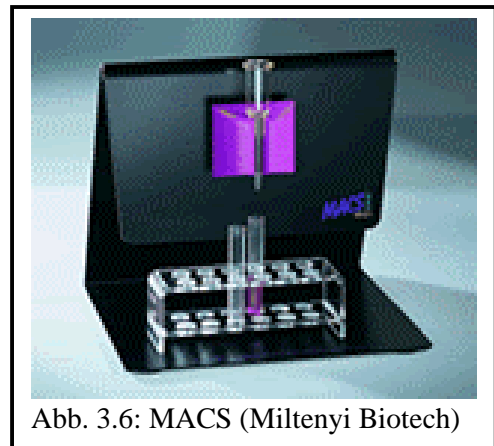


Abb. 3.6: MACS (Miltenty Biotech)

der Oberflächen im Metallgitternetz der Trennsäule. Mehrmals in die Säule gepresste PBS/FKS-Lösung ersetzt den Alkohol. Zur Zellseparation wird die Suspension von oben in die Säule gegeben und mit 5ml PBS/FKS gespült. Zum Auffangen der CD19-negativen Zellen (T-Zellen, Monozyten u.a.) werden Reagenzgläser (15ml) vorbereitet.

Um die T-Zellen zu gewinnen, spült man die Separationssäule außerhalb des magnetischen Feldes mit PBS/FKS. Die Zellen werden in RPMI/FKS (10%) gewaschen und anschließend wieder in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

Für die Analyse der Sekretion von Immunglobulinen und anderen Proteinen, wurden die B-Zellen unter Standardbedingungen kultiviert und deren Immunglobulinproduktion mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) analysiert [Niess JH 2000].

3.7 Durchflußzytometrie - Flourescence Activated Cell Sorter (FACS)

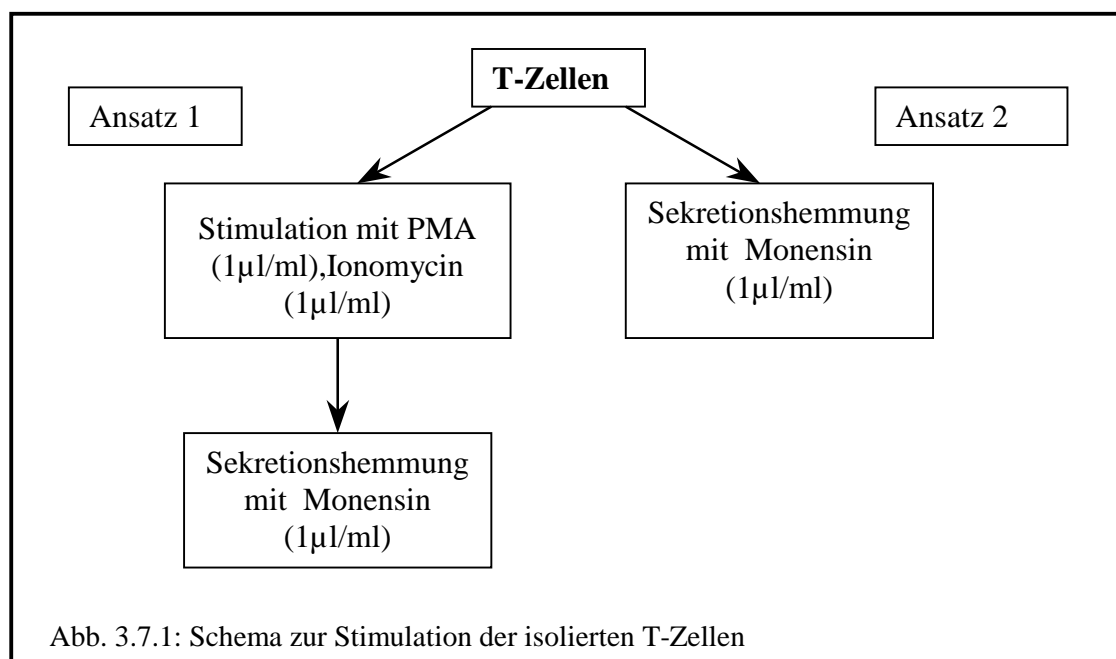
3.7.1 Untersuchung der Expression von CD154, IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 in T-Zellen

Die Lymphozyten werden nach der Zellseparation mittels MACS mit RPMI/FKS (10%) auf 2×10^6 Zellen pro ml und Ansatz eingestellt.

Für die durchflußzytometrischen Analysen werden zwei Ansätze vorbereitet, wobei Ansatz eins unspezifisch durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert wird. PMA ist ein häufig verwendeter Phorbolster mit vielfältigen Effekten. Er bindet an die Proteinkinase C und aktiviert sie. Desweiteren erfolgt eine unspezifische Stimulierung durch Ionomycin, welches zu einer Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle führt [Morgan and Jacob 1994]. Zellen werden dadurch z.B. zur Zytokinproduktion angeregt.

Diese Sekretion der Zytokine wird gleichzeitig mit Monensin gehemmt. Monensin ist ein Hemmstoff des intrazellulären Proteintransportes. Dabei werden nach Inkubation der Proteintransport zum Golgiapparat und die Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum blockiert [Jung, Schauer et al. 1993].

In einem zweiten Ansatz wurden die unstimulierten T-Zellen zur Kontrolle nur mit Monensin behandelt.

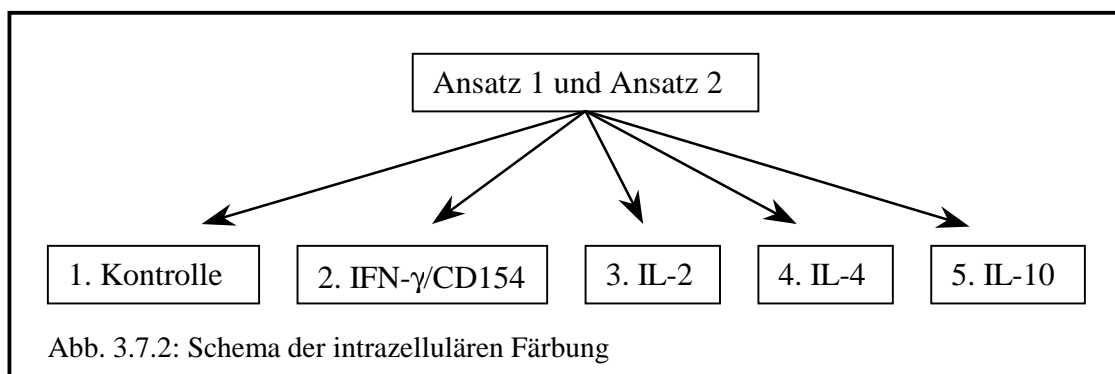


Die Ansätze werden 5 Stunden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO_2 , feuchte Atmosphäre) im Brutschrank inkubiert, anschließend in 2ml HBSS gewaschen, bei

2000U/min (760g) für 10 Minuten zentrifugiert und die Überstände mit einer Membranpumpe abgesaugt.

Die Fixation der Zellen erfolgt mittels Fixationslösung (0.05% Paraformaldehyd) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Ansätze werden nochmals in HBSS gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Für die intrazelluläre Markierung werden die Ansätze zunächst mit 1ml Permeabilisierungspuffer versetzt, bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert und mit HBSS gewaschen. Die Zellsuspension eines jeden Ansatzes wird gleichmäßig zu 200µl Zellen in HBSS auf jeweils 5 FACS-Röhrchen pro Ansatz aufgeteilt.



1. Kontrolle: 2,5µl Anti-Mouse IgG-FITC, RPE, RPE-Cy5
2. IFN-γ: 10µl Anti-human IFN-γ-FITC
2µl Anti-CD40 Ligand PE
10µl Anti-CD3 PerCP
3. IL-2: 10µl Anti-human IL-2-Biotin
10µl Anti-CD3 PerCP
10µl Streptavidin-PE
4. IL-4: 10µl Anti-IL-4-FITC (8F12 AK)
10µl Goat-anti-Mouse-Biotin
10µl Anti-CD3 PerCP und 10µl Streptavidin PE
5. IL-10: 10µl Anti-human-IL-10 AK
10µl Goat-anti-Mouse-Biotin
10µl Anti-CD3 PerCP und 10µl Streptavidin PE

Durch vortexen werden die Zellen resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem IL-2 Nachweis fügt man 10µl Streptavidin-PE zu, um mittels Kopplung von

Streptavidin-PE bzw. Streptavidin-Tricolor oder Streptavidin-FITC an den biotinylierten Antikörper stärkere Signale zu erzielen. Dem IL-4 und IL-10 Nachweis gibt man 10µl Goat-anti-Mouse-Biotin zu. Man resuspendiert wiederum und inkubiert 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zuletzt werden dem IL-4 und IL-10 Nachweis 10µl Anti-CD3 PerCP und 10µl Streptavidin PE zugesetzt, erneut wird resuspendiert und inkubiert.

Die Aufbewahrung der Ansätze erfolgt in je 150µl 0,05% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C im Dunklen. Obwohl man derartig fixierte Proben für mehrere Wochen aufbewahren kann, haben wir unsere Messungen innerhalb von 48 Stunden nach Färbung der Proben vorgenommen. Gemessen wird mit einem Durchflußzytometer (FACS, Becton Dickenson).

3.7.2 Durchflußzytometrische Auswertung der intrazellulären Färbung

Mit durchflußzytometrischen Untersuchungen können unter anderem innerhalb kurzer Zeit Antigene auf und in Zellen gemessen werden. Die mit farbkodierten Antikörpern markierten Zellen durchlaufen in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserlichtstrahl. Lichtphotonen werden von den Zellen nach Laserkontakt emittiert und gestreut und durch verschiedene Filter und Spiegel in die einzelnen Wellenlängen aufgetrennt und von Detektoren in analoge Signale, proportional zur Intensität des einfallenden Lichtes, umgewandelt. Diese Signale werden anschließend in numerische Form gebracht und sind zum Beispiel in Histogrammform darstellbar.

Anhand der Isotypenkontrollen werden Fenster für die statistische Auswertung zur Unterscheidung negativer und positiver Zellen festgesetzt (isotypspezifische Negativkontrolle). Wir haben zur weiteren Positiv-Negativ-Kontrolle Proben mit CD3 PerCP inkubiert, um die T-Zellen zu markieren. Die Lymphozyten werden durch „gaten“ (Eingrenzen der Meßsignale) eingestellt, um die gewünschten Zellen zu analysieren. Dabei werden durch die Einstellung des Forward-Scatters (FSC) die Zellen nach der Größe; durch die Einstellung des Sideward-Scatters (SSC) die Zellen nach der Granularität unterschieden. Anschließend werden die Fluoreszenzsignale analysiert.

Wie in Abb. 4.3 zu sehen ist, wurden der FSC und SSC so eingestellt, dass die Lymphozyten eingegrenzt werden konnten. Mit Hilfe der Antikörpermarkierung CD3, CD16 und CD19 erfolgte die weitere Differenzierung der NK-Zellen (CD16), T-Zellen (CD3) und B-Zellen (CD19). Die Abb. 3.7.3 zeigt die normale Verteilung (Prozentzahl) der oben genannten Zellen im Blut.

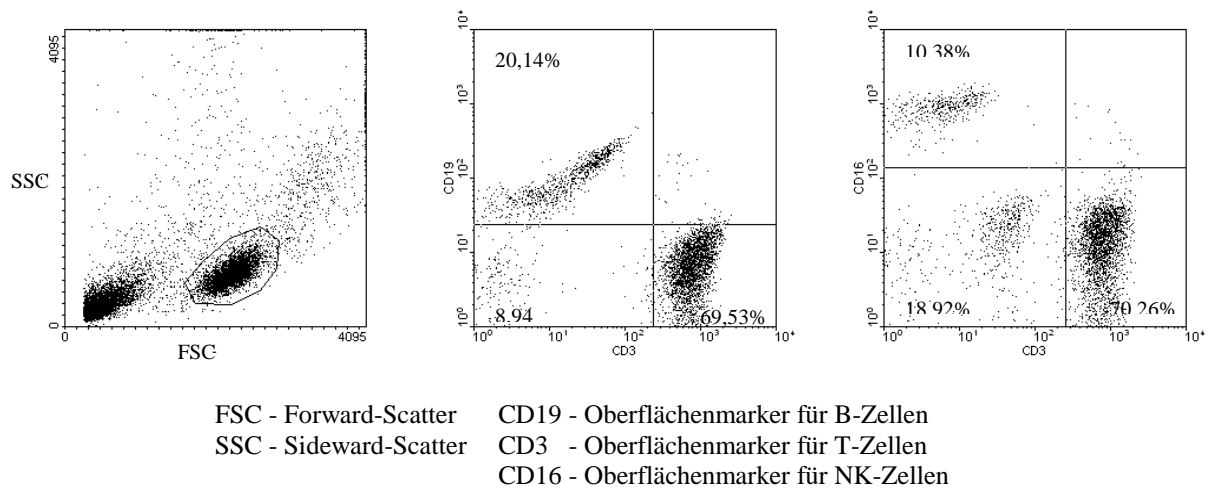


Abb. 3.7.3: Beispielhafte Darstellung verschiedener Lymphozytenpopulationen im Vollblut

In unserem Versuch wurden die T-Zellen (ca.70% der Lymphozyten) mittels MACS isoliert und aufgereinigt, zur durchflußzytometrischen Analyse die T-Zellen (CD3) markiert und die Expression von CD154, IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 in unstimulierten und stimulierten Zellen durch intrazelluläre Markierung gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm WinMDI Version 2,8. Die stimulierten und unstimulierten Proben wurden verglichen, indem die Prozente positiver Zellen vor und nach Stimulation in Prozente der Veränderung umgerechnet wurden.

Die Darstellung der Veränderungen im Expressionsmuster von CD154, IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 erfolgte in Balkendiagrammform.

3.8 Statistik

Für den Vergleich von Kontroll- und zweijähriger Therapiegruppe wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-(U)-Test unter der Voraussetzung nicht normalverteilter Stichproben angewandt. Für die Darstellung der patientengebunden Daten vor und unter Therapie wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Die Daten wurden mit dem Statistical Package for the Social Sciences statistical software for Windows, Version 9.0 (SPSS) ausgewertet. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen. Die Resultate sind als Median dargestellt.

3.9 Puffer und Reagenzien

10xPBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

87,66g NaCl
1,632g KH_2PO_4
5,66g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

PBS/FKS

1x PBS
50mM EDTA 8,0
0,01% Natriumazetat
1% FKS inaktiviert

PBS/Tween

500ml 1x PBS
3ml Tween

FKS/RPMI-Kulturmedium

90 ml RPMI
10 ml FKS inaktiviert
1 ml 100 x Glutamin
1 ml AAS (100x)

Paraformaldehydlösung (PFA 0,05%)

80 ml 1 x PBS
1 ml 4 % Paraformaldehydlösung in PBS

Blockinglösung

5% FKS in PBS

Einfriermedium

10% DMSO
40% FKS (inaktiviert)
50% RPMI

3.10 Herstellerangaben

RPMI	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
HBSS	Hölzel
FKS	Greiner
PBS	Cambrex
Tween	Fluka
Glutamin	Ferak Berlin
Ficoll	Nycomed
Reagenzgläser (15ml, 50ml)	Greiner
Kulturgefäße	Greiner
PMA	Hölzel
Ionomycin	Hölzel
Monensin	Hölzel
Fixationslösung	Hölzel
Permeabilisierungspuffer	Hölzel
Streptavidin PE	Hölzel
MACS-Antikörper	Miltenyi Biotech GmbH
Anti-human-INF- γ -FITC	Hölzel
Anti-CD40Ligand-PE	PharMingen
Anti-CD3 PerCP	Becton Dickinson
Anti-human-IL-2-biotin	Hölzel
Anti-IL-4 8F2	Novartis
Anti-human-IL-10	Caltag
Goat-anti-Mouse-Biotin	Jackson ImmunoResearch
EDTA	Carl Roth GmbH undCo, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma
AAS	Sigma
NaCl	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Sigma
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
DMSO	Serva
MACS	Miltenyi Biotech GmbH

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Expression von CD154, IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 in T-Zellen von 48 auf Milben, Gräser sowie Frühblüher allergischen Patienten vor und unter spezifischer sublingualer Immuntherapie untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen (44 Probanden). Bei 48 Patienten liegen bereits Resultate nach zwei bis dreijähriger SLIT vor. Mittels FACS-Analyse wurde der Prozentsatz der CD154- und Zytokin-positiven Zellen vor und nach unspezifischer Stimulation bestimmt und anschließend die Prozentzahl der Veränderung für die verschiedenen Allergiegruppen errechnet. Die Ergebnisse wurden für die drei Allergiegruppen getrennt sowie im ganzen betrachtet.

4.1 Darstellung der FACS-Ergebnisse

In den Abbildungen 4.1 bis 4.4 sind einige repräsentative FACS-Ergebnisse dargestellt.

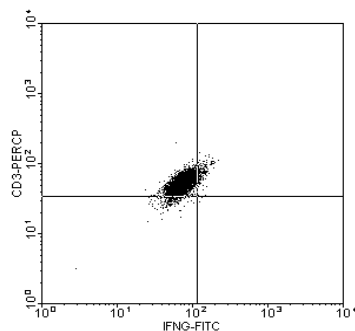


Abb. 4.1: Pat. 364, Darstellung der Expression von IFN- γ nach Hemmung mit Monensin. Der Hauptanteil der „Zellwolke“ befindet sich im oberen linken Quadranten und ist CD3⁺, IFN- γ ⁻.

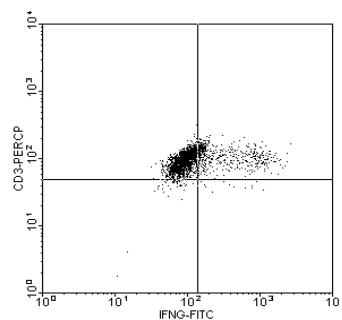


Abb. 4.2: Pat. 364, Darstellung der Expression von IFN- γ nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin. Zu sehen ist eine Verschiebung der CD3⁺-„Zellwolke“ in den oberen rechten Quadranten. Diese Zellen sind nach Stimulation IFN- γ ⁺.

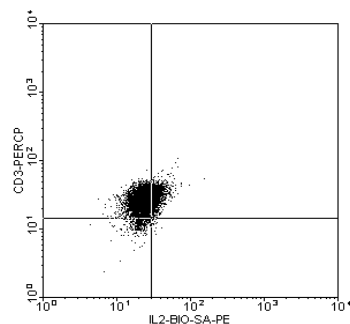


Abb. 4.3: Pat. 422, Darstellung der IL-2 Expression im FACS nach Hemmung mit Monensin.

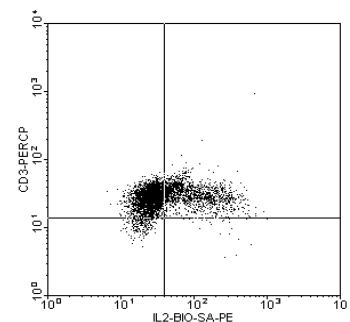


Abb. 4.4: Pat. 422, Darstellung der IL-2 Expression nach unspezifischer Stimulation mit deutlicher Verschiebung der CD3⁺-Zellpopulation in den rechten oberen Quadranten. Diese Zellen exprimieren IL-2.

4.2 CD 154

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der Expression von CD154 in T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin abgebildet. Es ist zu sehen, dass der Ligand für CD40 auf T-Zellen in der Kontrollgruppe kaum induzierbar war, während in der Allergikergruppe die Expression stark induziert wurde. Nach zwei bis drei jähriger sublingualer Immuntherapie war CD154 signifikant ($p=0,048$) niedriger als vor Therapie und verhielt sich ähnlich wie die Kontrollgruppe (Abb. 4.2.1). Bei der Betrachtung der einzelnen Allergikergruppen wurden ähnliche Veränderungen beobachtet, auch wenn die Abnahme der Induzierbarkeit nicht signifikant war. Eine stetige Abnahme war jedoch mit fortschreitender Therapie zu verzeichnen. In der Milbenallergikergruppe war die Abnahme der CD154- Expression auf das Niveau der Kontrollgruppe schon nach einem Jahr sublingualer Immuntherapie zu erkennen (Abb. 4.2.2), während bei der Gräserallergikergruppe eine Annäherung erst nach zwei Jahren Therapie stattfand (Abb. 4.2.3). In der Frühblühergruppe war der Abnahmetrend, wie in Abbildung 4.2.4 zu sehen ist, ebenfalls zu verzeichnen, auch wenn nach zwei Jahren SLIT nicht das Kontrollniveau erreicht wurde. Die Streuung der einzelnen Werte war zum Teil erheblich, wodurch besonders bei kleinen Fallzahlen große relative Fehler auftraten.

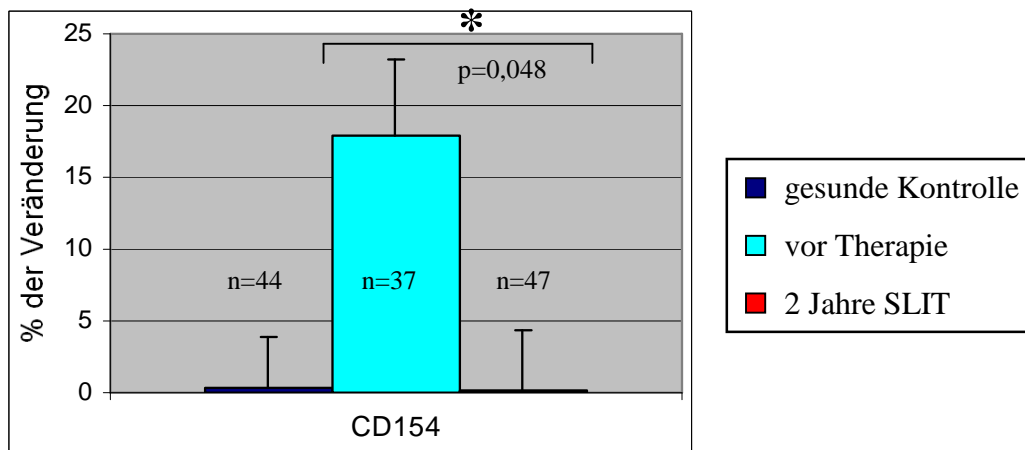


Abb. 4.2.1: Mediane der CD154 Expression, gesamte Allergiegruppe. Dargestellt sind die % der Veränderung nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin. Als Fehlerbalken sind die Standardfehler abgebildet.

Expression von CD154 in den einzelnen Allergikergruppen

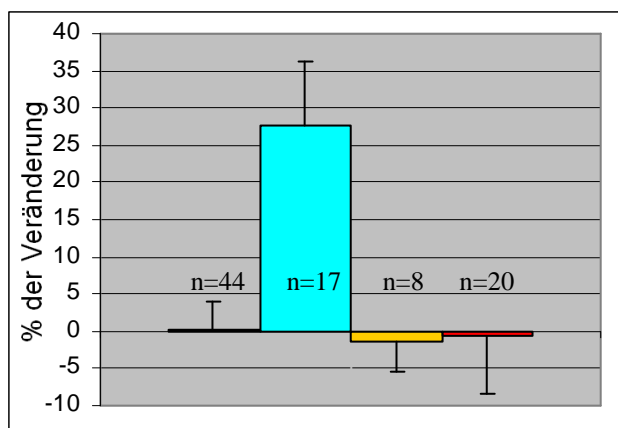


Abb. 4.2.2: Milbe, CD 154

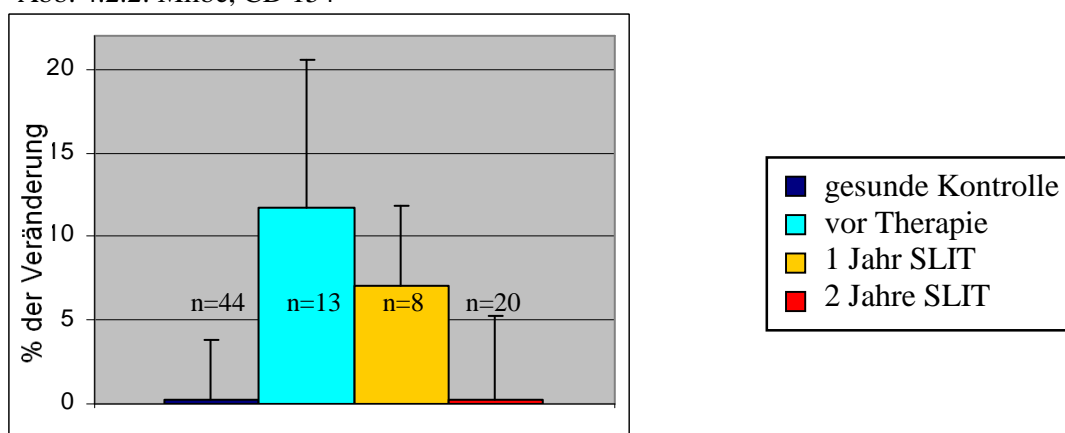


Abb. 4.2.3: Gräser, CD 154

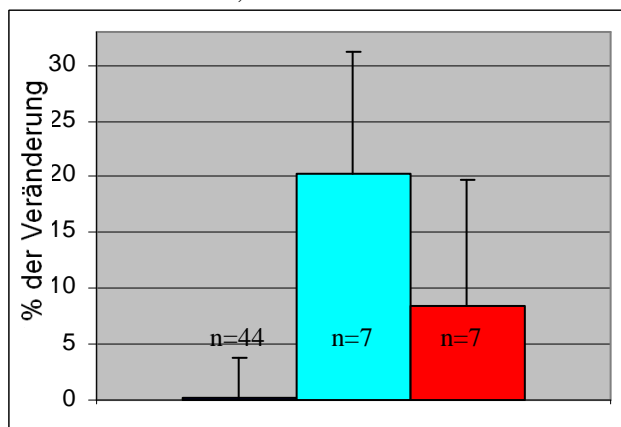


Abb. 4.2.4: Frühblüher, CD 154

Tab. 4.2: Irrtumswahrscheinlichkeiten

	vor Therapie-2 Jahre SLIT	Kontrolle-2 Jahre SLIT
Milbe	p=0,149	p=0,642
Gräser	p=0,972	p=0,162
Frühblüher	p=0,176	p=0,258

Irrtumswahrscheinlichkeiten der in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse, berechnet mit dem Mann-Whitney-(U)-Test unter der Voraussetzung nicht normalverteilter Stichproben bzw. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben.

4.3 IFN- γ

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der Expression von Interferon- γ in T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin abgebildet. Es fällt auf, dass in der Kontrollgruppe die Expression von IFN- γ in T-Zellen leicht abnahm. Im Gegensatz dazu kam es zu einer erhöhten Expression in der Allergikergruppe vor Therapie. Nach zwei Jahren sublingualer Immuntherapie wurde die Expression von IFN- γ nach Stimulation weiter gesteigert (Abb. 4.3.1). Somit ist eine Therapieentwicklung zu erkennen, die sich von den Kontrollen entfernt, was auf immunologische Veränderung, induziert durch die Therapie schließen lässt. Allerdings waren die Veränderungen, bedingt durch die teilweise sehr hohe Schwankungsbreite der Ergebnisse, nicht signifikant. Diese allgemeine Entwicklung ist auch in den einzelnen Allergiegruppen erkennbar, obgleich die Werte zu Beginn der Therapie stark schwanken (Abb 4.3.2 bis 4.3.4). Im Gegensatz zu der Expression von CD154 unter Therapie ist bei der Analyse von IFN- γ in allen Allergiegruppen nach zwei Jahren Therapie eine ähnlich erhöhte Expression zu verzeichnen.

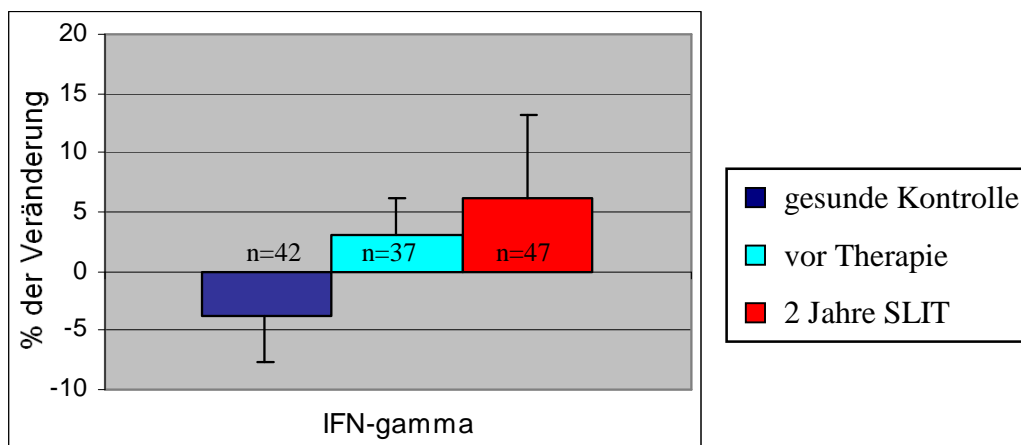
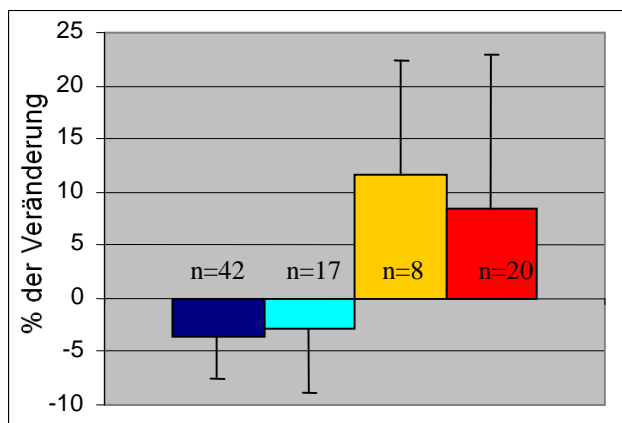
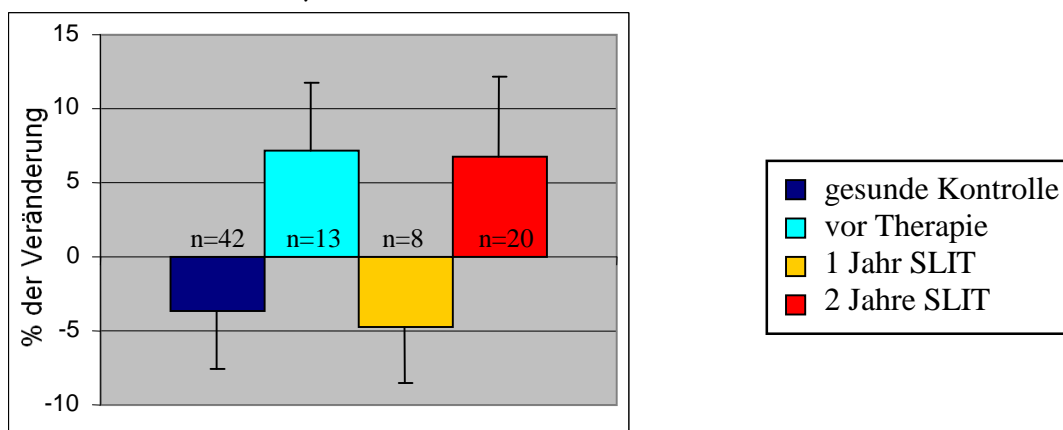
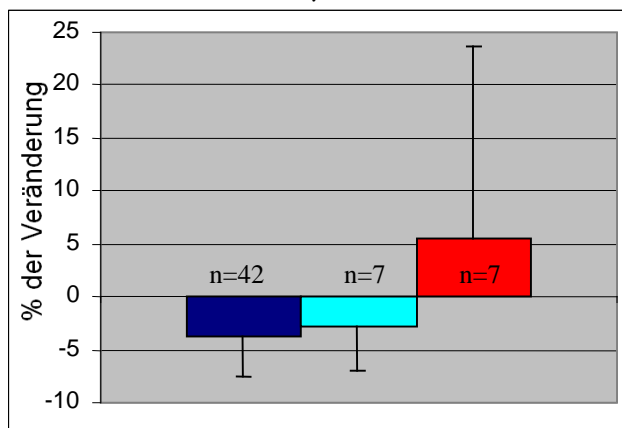


Abb. 4.3.1: Mediane der IFN- γ Expression, gesamte Allergiegruppe. Dargestellt sind die % der Veränderung nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin. Als Fehlerbalken sind die Standardfehler abgebildet.

Intrazelluläre Expression von IFN- γ in den einzelnen Allergikergruppen

Abb. 4.3.2: Milbe, IFN- γ Abb. 4.3.3: Gräser, IFN- γ Abb. 4.3.4: Frühblüher, IFN- γ **Tab. 4.3: Irrtumswahrscheinlichkeiten**

	vor Therapie-2 Jahre SLIT	Kontrolle-2 Jahre SLIT
Milbe	p=0,687	p=0,231
Gräser	p=0,249	p=0,133
Frühblüher	p=0,176	p=0,350

Irrtumswahrscheinlichkeiten der in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse, berechnet mit dem Mann-Whitney-(U)-Test unter der Voraussetzung nicht normalverteilter Stichproben bzw. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben.

4.4 IL-2

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der Expression von Interleukin-2 (IL-2) in T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin dargestellt. Deutlich wird, dass in der Kontrollgruppe die Expression von IL-2 in T-Zellen leicht abnahm. Im Gegensatz dazu war die Expression in der Allergikergruppe vor Therapie erhöht. Nach zwei Jahren sublingualer Immuntherapie wurde die Expression von IL-2 nach Stimulation weiter gesteigert. Somit ist, ähnlich wie bei IFN- γ , eine Therapieentwicklung zu erkennen, die sich von den Kontrollen signifikant ($p=0,001$) entfernt, was auf immunologische Veränderung, induziert durch die Therapie schließen lässt (Abb. 4.4.1). Diese allgemeine Entwicklung kann auch in den einzelnen Allergiegruppen nachvollzogen werden, obgleich die Werte zu Beginn der Therapie stark schwanken. In der Gruppe der Gräserallergiker fiel die Expression von IL-2 nach unspezifischer Stimulation im ersten Therapiejahr stark ab, glich sich aber im Folgejahr den Werten der anderen Allergikergruppen wieder an (Abb. 4.4.3). In dieser Gruppe konnte eine signifikante Erhöhung der IL-2-Expression in der Allergiegruppe nach zwei Jahren SLIT, verglichen mit der Kontrollgruppe, festgestellt werden ($p=0,002$). Ebenso verhielt sich die Milbenallergikergruppe ($p=0,019$). In dieser Gruppe wurde auch deutlich, wie in Abbildung 4.4.2 zu sehen ist, dass die IL-2-Expression nach zwei Jahren Therapie verglichen mit den Werten vor Therapie signifikant erhöht ist ($p=0,025$).

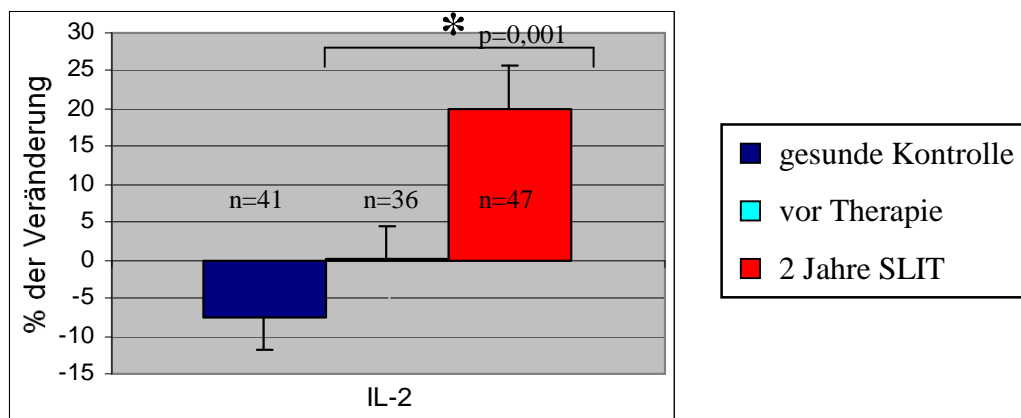


Abb. 4.4.1: Mediane der IL-2 Expression, gesamte Allergiegruppe. Dargestellt sind die % der Veränderung nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin. Als Fehlerbalken sind die Standardfehler abgebildet

Intrazelluläre Expression von IL-2 in den einzelnen Allergikergruppen

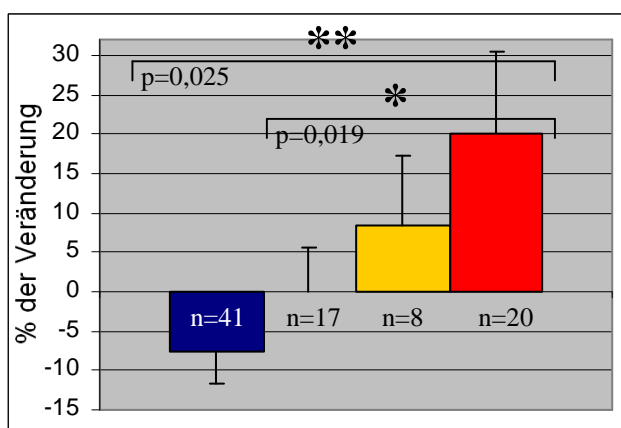


Abb. 4.4.2: Milbe, IL-2

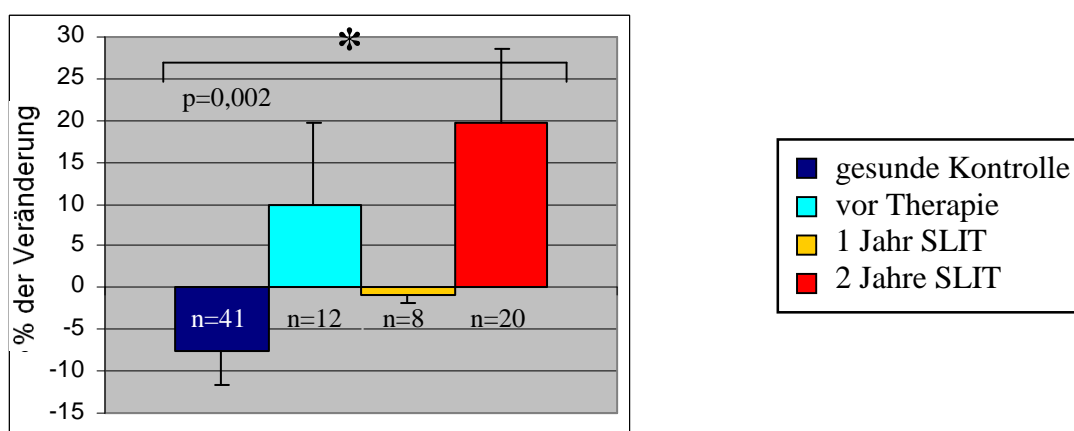


Abb. 4.4.3: Gräser, IL-2

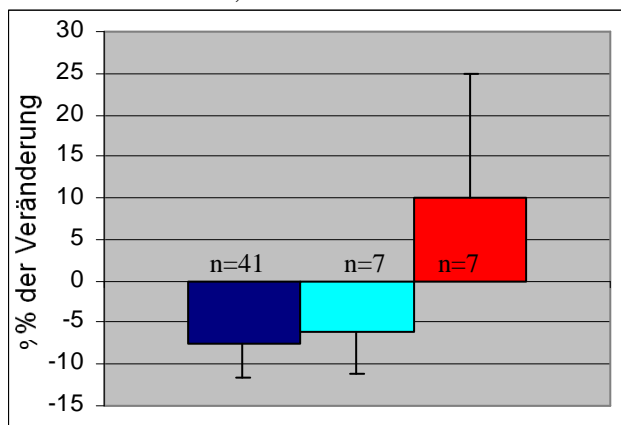


Abb. 4.4.4: Frühblüher, IL-2

Tab. 4.4: Irrtumswahrscheinlichkeiten

	vor Therapie-2 Jahre SLIT	Kontrolle-2 Jahre SLIT
Milbe	p=0,025	p=0,019
Gräser	p=0,136	p=0,002
Frühblüher	p=0,063	p=0,64

Irrtumswahrscheinlichkeiten der in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse, berechnet mit dem Mann-Whitney-(U)-Test unter der Voraussetzung nicht normalverteilter Stichproben bzw. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben.

4.5 IL-4

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der Expression von Interleukin-4 (IL-4) in T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin abgebildet. Es fällt auf, dass in der Kontrollgruppe die Expression von IL-4 in T-Zellen abnahm, ähnlich wie bei den Allergikergruppen vor Therapie. Nach zwei Jahren sublingualer Immuntherapie war die Expression von IL-4 nach Stimulation erhöht. Auch diese Werte lassen eine Entwicklung erkennen, die sich von den Kontrollen signifikant (Abb. 4.5.1, $p=0,003$) entfernt. Bei der Betrachtung der einzelnen Allergiegruppen fällt auf, dass vor Therapie bei Gräser- und Frühblüherallergikern ein leichter Anstieg der IL-4 Expression nach unspezifischer Stimulation zu erkennen ist, während die Milbenallergikergruppe sich ähnlich wie die Kontrollgruppe verhält (Abb. 4.5.2 bis 4.5.4). Dieser Unterschied ist auch nach einem Jahr SLIT zu beobachten, während sich die Werte nach zwei Jahren Therapie denen der anderen Allergiegruppen angleichen. In der Gruppe der Frühblüher ist eine signifikante Erhöhung der Expression von IL-4 im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu erkennen ($p=0,021$), was die allgemeine Entwicklung am deutlichsten beschreibt.

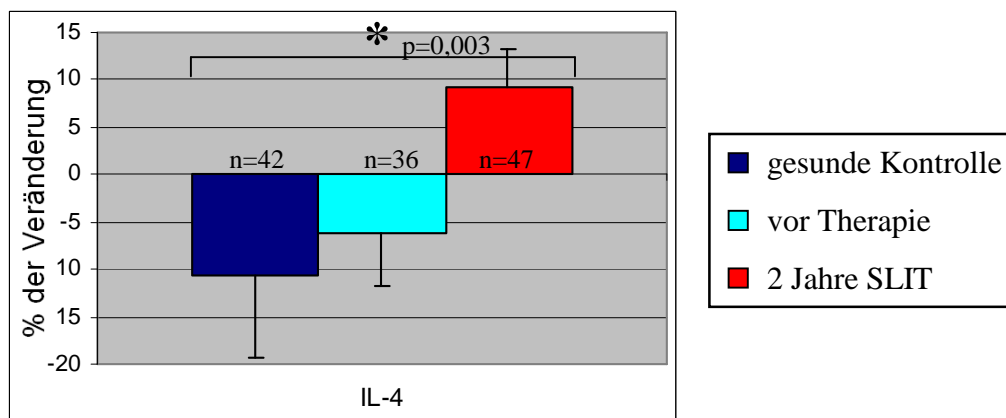


Abb. 4.5.1: Mediane der IL-4 Expression, gesamte Allergiegruppe. Dargestellt sind die % der Veränderung nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin. Als Fehlerbalken sind die Standardfehler abgebildet.

Intrazelluläre Expression von IL-4 in den einzelnen Allergikergruppen

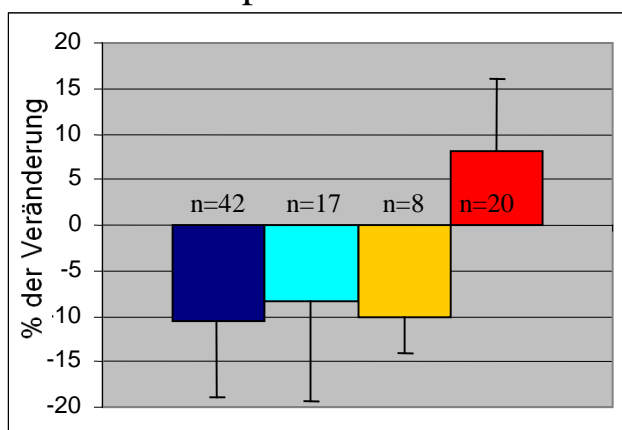


Abb. 4.5.2: Milbe, IL-4

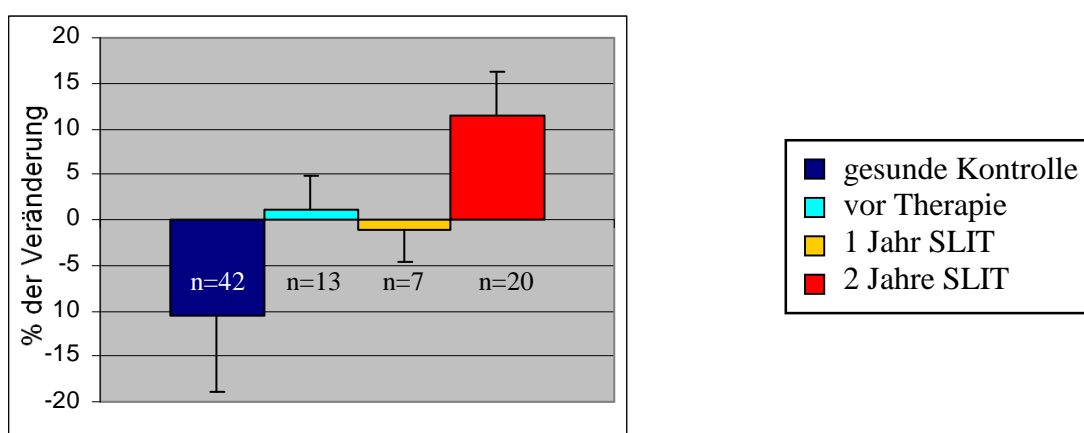


Abb. 4.5.3: Gräser, IL-4

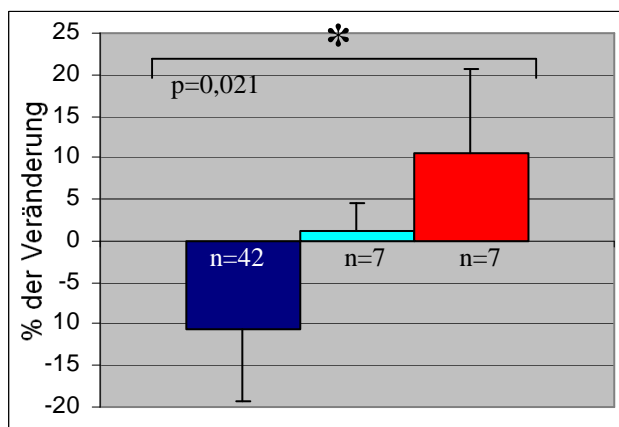


Abb. 4.5.4: Frühblüher, IL-4

Tab. 4.5: Irrtumswahrscheinlichkeiten

	vor Therapie-2 Jahre SLIT	Kontrolle-2 Jahre SLIT
Milbe	p=0,177	p=0,085
Gräser	p=0,176	p=0,270
Frühblüher	p=0,055	p=0,021

Irrtumswahrscheinlichkeiten der in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse, berechnet mit dem Mann-Whitney-(U)-Test unter der Voraussetzung nicht normalverteilter Stichproben bzw. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben.

4.6 IL-10

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der Expression von Interleukin-10 (IL-10) in T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin abgebildet. In der Kontrollgruppe kam es zu einer Abnahme der Expression in T-Zellen. Bei den Werten der Allergikergruppe vor Therapie kann ein leichter Anstieg der Expression nach unspezifischer Stimulation beobachtet werden (Abb. 4.6.1), während bei der Betrachtung der einzelnen Allergiegruppen die Werte stark differieren. Auch hier weisen die einzelnen Werte zum Teil erhebliche Schwankungen auf. Bei Milben- und Gräserallergikern kommt es vor Therapie zu einem Anstieg der IL-10-Expression (Abb. 4.6.2 und 4.6.3), während die Werte bei den auf Frühblüher allergischen Patienten ähnlich der Kontrollgruppe sind (Abb. 4.6.4). Nach einem Jahr sublingualer Immuntherapie kommt es in den vorliegenden Proben zu einer Annäherung verglichen mit den Kontrollwerten, während nach zwei Jahren Therapie die IL-10-Expression in allen drei Gruppen stark ansteigt und sich von den Kontrollwerten entfernt.

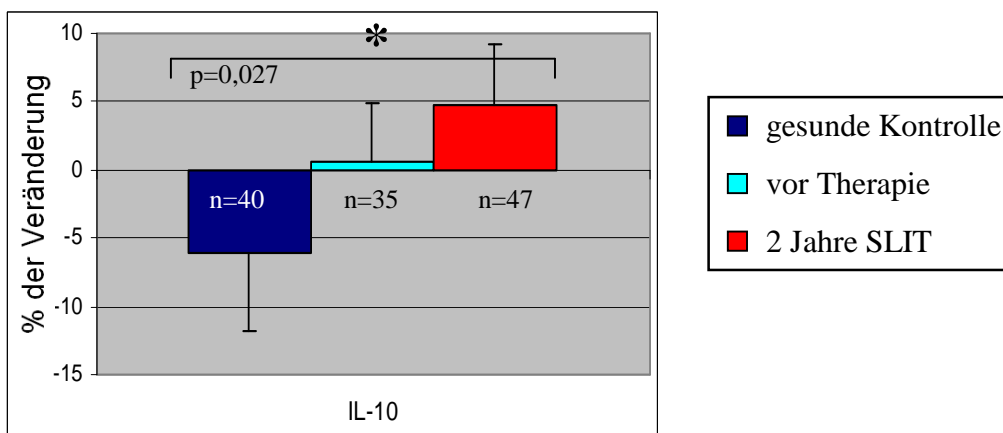


Abb. 4.6.1: Mediane der IL-10 Expression, gesamte Allergiegruppe. Dargestellt sind die % der Veränderung nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin. Als Fehlerbalken sind die Standardfehler abgebildet

Intrazelluläre Expression von IL-10 in den einzelnen Allergikergruppen

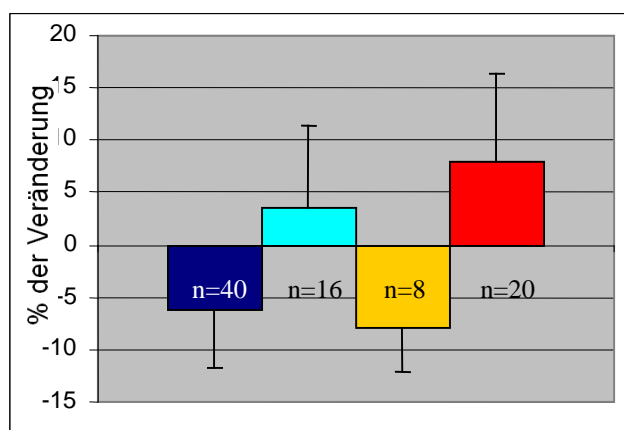


Abb. 4.6.2: Milbe, IL-10

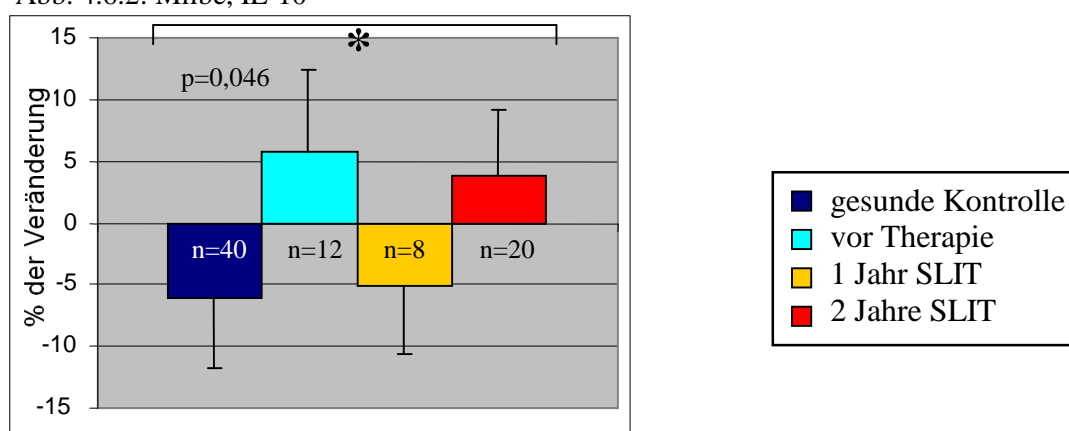


Abb. 4.6.3: Gräser, IL-10

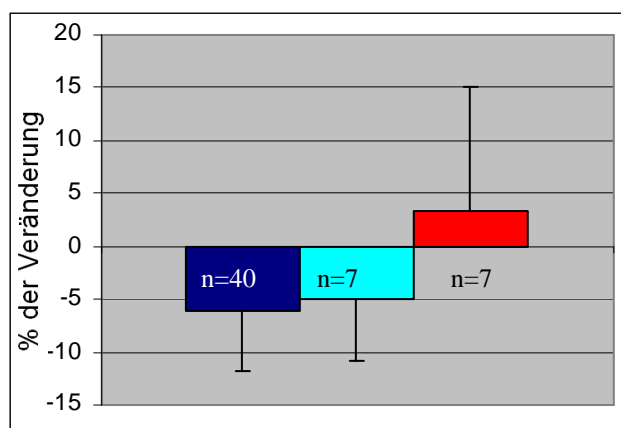


Abb. 4.6.4: Frühblüher, IL-10

Tab. 4.6: Irrtumswahrscheinlichkeiten

	vor Therapie-2 Jahre SLIT	Kontrolle-2 Jahre SLIT
Milbe	p=0,255	p=0,164
Gräser	p=0,117	p=0,046
Frühblüher	p=0,176	p=0,459

Irrtumswahrscheinlichkeiten der in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse, berechnet mit dem Mann-Whitney-(U)-Test unter der Voraussetzung nicht normalverteilter Stichproben bzw. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben.

5. Diskussion

Die Ergebnisse sind Zwischenergebnisse einer nicht-plazebokontrollierten, einfach blindgeführten Anwendungsbeobachtung.

Die Pathologie allergischer Erkrankungen wird als Fehlregulation eines Netzwerkes immunologischer Interaktionen zwischen Zytokinen und Zelloberflächenmolekülen, kostimulatorischen Faktoren und Adhäsionsmolekülen angesehen.

Eine besondere Rolle spielen dabei die T-Helferzellen und die von ihnen produzierten Interleukine. Aufgrund der verschiedenen Zytokinprofile unterscheidet man zwei große Untergruppen von Th-Zellen, deren Ausprägung zu einem frühen Zeitpunkt der Immunantwort stattfindet. Th1-Zellen bilden insbesondere IFN- γ , IL-2 und TNF- β und regulieren die zellvermittelte Immunität sowie die makrophagengesteuerte Abwehr bakterieller, viraler und Pilz-Infektionen.

Th2-Zellen sind an der Ausbildung der humoralen Immunantwort einschließlich der IgE-Produktion beteiligt. Sie spielen bei der Abwehr von Helmintheninfektionen und bei Allergien vom Soforttyp eine zentrale Rolle. Die von ihnen sekretierten Zytokine IL-4 und IL-13 wirken synergistisch auf die IgE-vermittelte Typ-I-Reaktion. Darüber hinaus ist IL-4 ein potenter Mastzellaktivator. Weitere von Th2-Zellen sekretierte Zytokine sind IL-5, das die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten bewirkt, und IL-9, das unterschiedliche Zelltypen wie T- und B-Zellen, Mastzellen und Eosinophile aktivieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Erstkontakt mit einem Allergen, die Prägung der nativen Th-Zellen bei Atopikern in Richtung Th2, bei nicht atopischen Personen in Richtung Th1 stattfindet [Wierenga, Snoek et al. 1990; Parronchi, Macchia et al. 1991].

Die Differenzierung von B-Zellen in IgE-exprimierende Zellen hängt von mehreren Signalen ab. Der B-Zellantigenrezeptor bestimmt die antigenspezifische Immunantwort. Die von Th2-Zellen sezernierten Interleukine -4 und -13 sowie die Interaktion des CD40-Moleküls auf der Oberfläche von B-Zellen mit dem CD40-Ligand (CD154) auf aktivierten T-Zellen bewirken den Immunglobulinklassenwechsel [Clark and Ledbetter 1994; Jelinek 2000]. Die bei Allergikern gefundene überschießende IgE-Produktion wird als ein Ungleichgewicht des Th1/Th2 Verhältnisses mit einer vermehrten Aktivierung von Th2-Zellen bzw. einer Suppression der Th1-Zellen erklärt.

Ein möglicher Mechanismus der spezifischen Immuntherapie (SIT) könnte, wie in mehreren Studien nachgewiesen, eine Verschiebung eben dieses Ungleichgewichtes im Sinne eines Th1/Th2-Shiftes sein [Jutel, Pichler et al. 1995; Bellinghausen, Metz et al. 1997; Keskin, Inal et al. 1999; Majori, Caminati et al. 2000]. Neben einer Korrektur dieses Ungleichgewichtes ist auch an eine Anergie als möglicher Wirkmechanismus denkbar. Mueller et al. zeigten, dass bei Stimulation über den T-Zellrezeptor bei fehlendem kostimulatorischen Signal eine T-Zell-Anergie induziert wird [Mueller, Jenkins et al. 1990].

In dieser Untersuchung sollten die oben angeführten Beobachtungen vor und während einer SLIT sowie im Vergleich zu Gesunden untersucht und kritisch bewertet werden. Die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 sowie CD154 wurden nach unspezifischer Stimulierung intrazellulär gemessen.

Es fanden sich deutliche Unterschiede im Zytokinprofil von Allergikern und Kontrollen vor Therapiebeginn. Dabei scheinen Atopiker eine signifikant gesteigerte CD154-Expression nach unspezifischer Stimulierung gegenüber den gesunden Kontrollen aufzuweisen [Bär 2001]. Dies ließ sich in unserer Untersuchung unter SLIT supprimieren. Wie auch in anderen Studien beobachtet, gibt es Hinweise darauf, dass es unter einer erfolgreichen SLIT zu einer Verschiebung des bei atopischen Erkrankungen zu findenden Th2-Übergewichtes zugunsten einer gesteigerten Th1-Antwort kommt. Kritisch anzumerken ist, dass bei diesen Studien der Shift in der Th2/Th1-Antwort sehr variabel ist, und die verschiedenen Interleukine in wechselndem Maße ansteigen, oder aber konstant bleiben.

Nach vorläufiger Evaluierung der klinischen Parameter zeigt sich nach 2 bis zu 3-jähriger SLIT eine deutliche Besserung des subjektiven Befindens der Patienten: die Häufigkeit von Asthmaanfällen und Begleitezemen nahm ab. Des Weiteren fand sich eine Abnahme des IgE-gesamt sowie der RAST-Klasse [Niess 2001].

Im Folgenden sollen die gemessenen intrazellulären Zytokin- und CD154-Werte von allergischen Kindern und gesunden Kontrollen im einzelnen diskutiert werden.

5.1 CD154

CD154 (CD40Ligand) ist ein Rezeptormolekül auf T-Zellen und führt in Zusammenhang mit anderen Signalen bei der Interaktion mit B-Zellen zu Proliferationsinduktion [Lane, Traunecker et al. 1992; Noelle, Roy et al. 1992], Immunglobulinklassenwechsel [Aruffo, Farrington et al. 1993; Fuleihan, Ramesh et al. 1993; Renshaw, Fanslow et al. 1994], Antikörperproduktion [Rousset, Garcia et al. 1991; Grabstein, Maliszewski et al. 1993] und Schutz vor Apoptose [Liu, Joshua et al. 1989; Liu, Mason et al. 1991; Fang, Nath et al. 1997].

Wir haben die CD154-Expression nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin im Blut von Allergikern intrazellulär vor und während 2 bis 3 jähriger SLIT sowie gesunden nichtallergischen Kontrollen verglichen. Vor einer SLIT wiesen die Allergiker eine signifikant erhöhte CD154-Produktion gegenüber der Kontrollgruppe auf.

Unter Therapie zeigte sich eine Abnahme der CD154-Expression. Nach 2 bis 3 jähriger SLIT zeigt sich eine deutliche Abnahme der Expression auf den untersuchten T-Zellen, am deutlichsten bei den Milbenallergikern. Auch Wingett et al. wiesen eine erhöhte Expression von CD154 bei Asthmatikern nach [Wingett and Nielson 2003]. Siegmund et al. konnten eine erhöhte CD154-Expression im Blut von Patienten mit Wespengiftallergie feststellen [Siegmund, Vogelsang et al. 2000]. Dabei scheint die Fähigkeit der B-zellabhängigen CD154-Produktion in T-Zellen von Allergikern um ein vielfaches größer zu sein als bei Gesunden [Hermes, Worm et al. 1997]. Naksted et al. zeigten, dass Birkenpollenallergene nur bei Atopikern eine CD154-Expression auf CD3-positiven Lymphozyten induzieren. Die CD154-Expression war dabei immer bei den Atopikern höher verglichen mit Nichtatopikern [Nakstad, Kahler et al. 1999]. Wie in den Abbildungen 4.2.2 bis 4.2.4 zu sehen ist, finden sich deutlich erniedrigte Expressionen von CD154 sowohl bei Milben-, Gräser- als auch Frühblüherallergikern unter Therapie verglichen mit der Expression vor Therapie. Auch bei Betrachtung der gesamten Allergikergruppe zeigt sich in Abbildung 4.2.1 eine signifikante Erniedrigung ($p=0,046$) der CD154-Expression nach 2 bis 3jähriger SLIT.

CD154 ist maßgeblich am Immunglobulinklassenwechsel zum IgE durch seine Interaktion mit CD40 auf der Oberfläche von B-Zellen beteiligt. Eine Reduktion der CD154-Expression auf T-Zellen durch eine SLIT könnte zu einer Abnahme der IgE-Produktion, und damit zu einer Symptomlinderung oder sogar Symptommfreiheit führen.

5.2 IFN- γ /IL-2

Physiologischerweise wird IFN- γ von Th1-Zellen, zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und Virus-infizierten Zellen produziert. Neben der antiviralen und antiparasitären Funktion spielt es eine zentrale Rolle als Immunmodulator. Im Gegensatz zu IL-4 senkt es die IgE-Produktion, was darauf hindeutet, dass beide Interleukine antagonistisch zueinander wirken. Es stimuliert selektiv die Proliferation und Differenzierung von Th1-Zellen und inhibiert gleichzeitig die Proliferation von Th2-Zellen [Gajewski and Fitch 1988].

Wir konnten beobachten, dass die Bereitschaft der Lymphozyten von Patienten unter SLIT, auf einen unspezifischen Stimulus IFN- γ zu produzieren, gestiegen ist (Abb. 4.3.1 bis 4.3.4). Auch in anderen Studien konnten Anstiege der IFN- γ Produktion unter SIT beobachtet

werden [Lack, Nelson et al. 1997]. Dagegen gibt es aber auch Studien, die keine signifikanten Unterschiede der IFN- γ -Expression von Atopikern unter spezifischer Immuntherapie gefunden haben [Keskin, Inal et al. 1999; Kakinoki, Ohashi et al. 2000].

IL-2 gehört zu den von Th1-Zellen produzierten Interleukinen. Es dient via IL-2 Rezeptoren und STAT3-Signaltransduktion als autokrines Signal, was wiederum die IL-2 Produktion fördert und unter anderem zu einer T-Zell Proliferation führt und adaptive Immunantworten initiiert.

In unserer Untersuchung kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-2 Expression unter Therapie. Am deutlichsten zeigte sich dies in der Milbenallergikergruppe ($p=0,025$), wie in Abb. 4.4.2 dargestellt ist. Auch bei Betrachtung der gesamten Allergikergruppe (Abb. 4.4.1) fand sich ein signifikanter Anstieg unter 2 bis 3 jähriger Therapie im Vergleich zu vor Therapie ($p=0,001$). Eine Annäherung an das Niveau der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich aber nicht.

De Amici et al. zeigten in ihrer Untersuchung, dass IL-2 im Serum von auf Hausstaubmilben allergischen Patienten unter SIT ansteigt und sich dem Niveau der gesunden Kontrollgruppe annähert [De Amici, Puggioni et al. 2001].

Eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th2 gilt bei allergischen/atopischen Erkrankungen allgemein als ursächliches Phänomen. Es ist zu erwarten, dass eine Umkehrung dieses Ungleichgewichtes den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann. Daher könnte eine solche Umkehrung Ziel kausaler Behandlungsmethoden sein und gleichzeitig als Marker für einen Therapieerfolg dienen. In unserer eigenen Beobachtung konnten wir teilweise signifikante Anstiege von IFN- γ und IL-2 feststellen, wenn auch mit relativ großer Schwankungsbreite und ohne Vorhersagekraft für den klinischen Verlauf des individuellen Patienten.

In zahlreichen Studien wurde die Rolle des verminderten Th1/Th2-Verhältnisses im Pathomechanismus der Allergien dargestellt [Robinson, Hamid et al. 1992; Kay 2001; Wong, Ho et al. 2001].

Die genauen Wirkmechanismen von Immuntherapien bei Allergien sind noch nicht geklärt. Die Induktion einer – wie auch von uns beobachteten - gesteigerten Bereitschaft der Patienten zur Produktion von Th1-Interleukinen scheint eine entscheidende Rolle zu spielen [Romagnani 1992]. Dabei wurde in mehreren Studien darauf hingedeutet, dass es bei der SLIT zu einer Re-Orientierung der Immunantwort durch einen Shift in der Th2/Th1-Balance kommen könnte [Varney, Hamid et al. 1993; Durham, Ying et al. 1996; Levy, Kristofic et al.

1997; Van der Pouw Kraan, Van der Zee et al. 1998; Benjaponpitak, Oro et al. 1999; Klimek, Reske-Kunz et al. 1999; Di Rienzo, Marcucci et al. 2003; Ippoliti, De Santis et al. 2003].

Die Regulation der T Zellen unterliegt größtenteils dem Einfluss Antigen präsentierender Zellen (APC). APC übermitteln ihre Signale über Oberflächen- und lösliche Moleküle, deren Produktion von der Art, Konzentration und Expositionsdauer der Antigene sowie möglichen begleitend aufgenommenen Substanzen oder unspezifischen Reizen (Temperatur, mechanische Beanspruchung, Zellstress, toxische Substanzen und andere) abhängen.

Es wird vermutet, dass unter Immuntherapien, die Funktion von dendritischen Zellen so beeinflusst wird, dass diese ihrerseits ihr Zytokinprofil umstellen (vor allem von einer IL-4-Produktion zu IL-12), wodurch wiederum die Interleukin-Freisetzung in T Zellen moduliert wird. Dabei induziert IL-12 vor allem die Produktion von Th1-Interleukinen [Marshall, Secrist et al. 1995; Grzela, Grzela et al. 2002; Tazaki, Minoguchi et al. 2004].

Einige Studien mit Tiermodellen zeigen interessante Informationen: Die dendritischen Zellen der oralen Mukosa agieren als effiziente APCs und produzieren IL-12, welches die Immunantwort in Richtung eines Th1-Profiles weg von einer übersteigerten Th2-Antwort dirigieren kann [Van Wilsem, Van Hoogstraten et al. 1994; Hasseus, Dahlgren et al. 1995; Macatonia, Hosken et al. 1995].

Im Gegensatz zu den Tiermodellen, ist die immunologische Antwort der SLIT bei Menschen aber schwer zu demonstrieren.

Nach Gabe von radiomarkierten Iod (I^{123})-Allergen bei erwachsenen Volontären zeigte sich keine direkte Absorption des Allergens durch die Mukosa. Die Plasmaradioaktivität stieg erst nach Schlucken des Allergens an [Bagnasco, Mariani et al. 1997]. Dabei verblieb es eine lange Zeit in der oralen Mukosa (bis zu 20 Stunden). Weiterhin zeigten Studien, dass die Permeabilität der Mukosa gegenüber Makromolekülen bei Allergikern höher als bei Gesunden ist [Buckle and Cohen 1975; Falagiani and Mistrello 1997]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das Allergen im lokalen oralen Immunsystem prozessiert wird [Bagnasco, Passalacqua et al. 2001]. Bieber et. al. zeigten, dass Langerhans-Zellen der oralen Mukosa nach Prozessierung und Präsentation von Allergenfragmenten Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) produzieren. IDO ist ein Tryptophan katabolisierendes Enzym mit regulatorischen Effekten auf T-Zellen. Tryptophan ist für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen essenziell. Bei einem Abbau dieser Aminosäure durch IDO kommt es durch Tryptophanmangel zu einer Funktionshemmung und Apoptose der T-Zellen. Dies wird sowohl durch den Tryptophanabbau als auch durch die Anreicherung von Metaboliten erreicht [Kreuzkamp 2004; von Bubnoff, Fimmers et al. 2004].

Antigenpräsentation kann entweder zur Prägung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen oder zu einer funktionellen Inaktivierung und T-Zell-Toleranz führen. Das Aufdecken der Faktoren, die die Balance zwischen Toleranz und Antwort regulieren, ist von großer Bedeutung. Man geht davon aus, dass die kritischen Faktoren in der Natur der Antigen Präsentierenden Zellen liegen. Darüber hinaus sind sowohl die Anzahl der dendritischen Zellen, die einen Lymphknoten erreichen und ihre Lebensspanne, als auch von diesen Zellen exprimierte kostimulatorische Moleküle und Zytokine von Bedeutung [Sallusto and Lanzavecchia 1999; Dieli 2003].

5.3 IL-4

Interleukin-4 wird von aktivierten Th2-Zellen sezerniert und wirkt vorwiegend auf B-Zellen, Makrophagen und Mastzellen. Es steigert die Proliferation und Differenzierung, sowie die bei der allergischen Reaktion überschießende IgE-Produktion, und gilt als einer der wichtigsten Stimulatoren bei allergischen Erkrankungen..

Wir haben in unseren Untersuchungen überraschenderweise beobachtet, dass auch die Bereitschaft der T Lymphozyten unter SLIT, IL-4 zu produzieren bei den Gräserallergikern ($p=0,021$) sowie bei Betrachtung der gesamten Allergieguppe ($p=0,003$) signifikant ansteigt (Abb. 4.5.3, 4.5.1). Wie oben beschrieben verläuft dieser Anstieg parallel zu einem Anstieg von IL-2, IFN- γ und IL-10, so dass sich das Verhältnis dieser Faktoren untereinander nicht maßgeblich verschiebt. Vielleicht ist der Anstieg der Th1-Zytokine entscheidender für den Erfolg einer spezifischen Immuntherapie als der Th2-Spiegel. Der gleichzeitige Anstieg der anderen Zytokine kann die Wirkung von IL-4 teilweise aufheben oder blockieren. Auch Huang et al. fanden in ihrer Studie einen Anstieg sowohl der Th1- als auch Th2-Zytokine unter spezifischer Immuntherapie [Huang, Chen et al. 2003]. Es ist möglich, dass sowohl Th1- als auch Th2-Zellen durch das verabreichte Allergen zu Beginn aktiviert wurden und später dann eine Toleranz gegenüber hohen Mengen an Antigen auftrat.

Ähnlich widersprüchlich erscheint der vielfach beobachtete Anstieg von IgE unter Immuntherapien, der aber nicht mit einer Verschlechterung der Symptomatik einhergeht [van der Zwan, Flinterman et al. 1983; Lack, Nelson et al. 1997; Hirata, Yukawa et al. 1999].

5.4 IL-10

IL-10 wurde zuerst als Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (CSIF) beschrieben, der von Th2-Zellen der Maus produziert wird und in der Lage ist, die Proliferation speziell von Th1-Zellen zu supprimieren. Heute weiß man, dass es von einer Vielzahl von Zellen inklusive Th1- und Th2-Zellen, NK-Zellen und Monozyten sezerniert wird. Im Menschen wird es vorwiegend von regulatorischen T-Zellen sezerniert. Es wirkt auf Monozyten, Makrophagen und moduliert ihre Fähigkeit, Th1-Zellen zu aktivieren. Durch die Beeinflussung der biologischen Aktivität der Makrophagen reduziert IL-10 indirekt die Zytokinproduktion der Th1-Zellen (IFN- γ , IL-2).

Weiterhin stimuliert es Funktionen der eigenen Immunität (NK-Zellaktivität, Beseitigung von Zellen und Mikroben durch Stimulation der Phagozytose) und der Th2-abhängigen Immunität, supprimiert aber die mit der Entzündung verbundene Immunantwort (Th1, proinflammatorische Zytokinsekretion durch Makrophagen) direkt und indirekt.

In unserer Beobachtung kam es unter SLIT zu einem Anstieg der intrazellulären IL-10-Produktion. Am deutlichsten zeigte sich dies, wie in Abbildung 4.6.3 zu sehen ist, bei den Gräserallergikern ($p=0,046$). Bei Betrachtung der gesamten Allergikergruppe (Abb. 4.6.1) zeigt sich ein signifikanter Anstieg ($p=0,027$) der intrazellulären IL-10-Expression. Auch Bellinghausen et al und Akdis et al zeigten signifikante Steigerungen der IL-10-Produktion unter Wespengifttherapie [Bellinghausen, Metz et al. 1997; Akdis, Blesken et al. 1998]. In einer anderen Studie wiesen Nouri-Aria et al. eine gesteigerte IL-10 mRNA-Expression in CD3⁺-Zellen mit einem gleichzeitigen Anstieg der IgG- und IgG4-Konzentration bei Gräseratopikern während einer SIT nach [Nouri-Aria, Wachholz et al. 2004].

Dies lässt darauf hindeuten, dass IL-10 maßgeblich an der Immunmodulation im Rahmen einer spezifischen Immuntherapie beteiligt ist und eine allergenspezifische Toleranz in peripheren T-Zellen induzieren kann [Akdis and Blaser 1999].

Es inhibiert die Proliferation und Zytokinantwort sowohl von Th1- als auch Th2-Zellen in vitro und in vivo [Wang, Wu et al. 1994]. Es supprimiert die IL-5 Produktion humaner T-Zellen und reduziert die Funktion der Eosinophilenfunktion in Mäusen [Schandene, Alonso-Vega et al. 1994; Zuany-Amorim, Creminon et al. 1996]. IL-10 kann somit vermutlich als Inhibitor der Th2-Antwort agieren. Es blockiert die APC abhängige CD28-B7 Interaktion und kostimulatorische Signale in T-Zellen, was zu einer funktionellen Inaktivierung führen kann [Schandene, Alonso-Vega et al. 1994].

5.5 Klinik

Die Evaluierung klinischer Parameter zeigte in unserer Untersuchung eine deutliche Besserung des subjektiven Befindens der Patienten. Die Häufigkeit von Asthmaanfällen und Ekzemen nahm ab. Daneben konnte eine Abnahme der RAST-Klasse festgestellt werden. Zum aktuellen Zeitpunkt kann noch keine endgültige Aussage über die Korrelation einzelner Werte unserer Studie mit diesen Parametern getroffen werden. Dies wird Gegenstand weiterführender Dissertationen. An unserer Klinik werden momentan Untersuchungen per Telefonbefragung zur klinischen Langzeitwirkung durchgeführt, die auch mehrere Jahre nach Therapie auf eine Besserung der Symptomatik hindeuten.

Zu klinischen Parametern können inzwischen mehrere Studien herangezogen werden, die belegen, dass die SLIT ein effektives Mittel in der Therapie allergischer Erkrankungen ist. Es wurden Symptombesserung, Medikamentenverbrauch, Provokationstests sowie IgE- und IgG4-Bestimmungen für die Beurteilung der Effektivität herangezogen. So fanden Fanta et al. und Bousquet et al. bei sublingual therapierten Patienten einen Anstieg des IgE_{spez} und IgG4 [Bousquet, Scheinmann et al. 1999; Fanta, Bohle et al. 1999]. Dagegen zeigen andere Studien keine Änderungen dieser Immunglobuline unter Therapie [D'Ambrosio, Ricciardi et al. 1996; Vourdas, Syrigou et al. 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass unter SLIT eine deutliche Abnahme der Symptomatik auftrat und der Medikamentenverbrauch sank [Clavel, Bousquet et al. 1998; Pradalier, Basset et al. 1999; Pajno, Morabito et al. 2000]. In einer neueren Untersuchung von Khinchi et al. wurde die SLIT mit der SCIT verglichen. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Therapieformen in Bezug auf Symptomatik und Medikamentenverbrauch gefunden. Beide Therapien waren der Plazebogruppe deutlich überlegen und in der SLIT Gruppe traten keine systemischen Nebenwirkungen auf [Khinchi, Poulsen et al. 2004].

Einige dieser Studien werden in kurzer Form am Ende der Diskussion vorgestellt.

Die Nebenwirkungsraten der bisher veröffentlichten Studien sind deutlich geringer als die der subkutanen Immuntherapie. Die am häufigsten aufgetretene Nebenwirkung war dabei Juckreiz im Mund- und Rachenraum [Pajno, Morabito et al. 2000; Bahceciler, Isik et al. 2001; Khinchi, Poulsen et al. 2004]. In einer Studie von La Rosa et al. kam es zu vermehrten gastrointestinalen Beschwerden. Dabei lag die kumulative Allergendosis aber 375 mal über der der subkutanen Immuntherapie [La Rosa, Ranno et al. 1999]. Kopfschmerzen, Rhinorrhoe, Obstipation und Urtikaria traten nur sporadisch auf und die Inzidenz unterschied sich nicht von der der Plazebogruppe [Canonica and Passalacqua 2003]. Die verminderte

Nebenwirkungsrate, die bequeme und leichte Applikationsweise, sowie die zunehmende Freiheit des Patienten sind wesentliche Vorteile der SLIT [Passalacqua, Venturi et al. 1999].

5.6 Kritische Betrachtung der Methodik

Beim Vergleich verschiedener Studien differieren die Ergebnisse der Zytokinproduktion von T-Zellen bei Patienten vor und unter spezifischer Immuntherapie zum Teil erheblich.

Dies kann mehrere Ursachen haben.

Zytokinexpression

In einer Studie von Movérare et al. werden zum Beispiel nur Patienten eingeschlossen, deren periphere Blutmonozyten (PBMC) eine positive Proliferationsantwort auf Birkenpollenallergen zeigen [Moverare, Elfman et al. 2000]. Weiterhin finden sich Unterschiede für den Nachweis der Zytokine. So werden in einigen Studien die Serumkonzentrationen der verschiedenen Interleukine bestimmt, während in anderen, inklusive unserer Untersuchung, intrazelluläre Zytokinproduktionen nach meist unterschiedlichen Stimulations-Schemata gemessen wurden. Für jedes einzelne Zytokin finden sich unterschiedliche Inkubationszeiten, die für eine optimale Expression benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Spitzenexpression von Zytokinen verschiedener Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten, was dazu führen kann, dass bei einer festgelegten Stimulationsdauer die Hauptexpression schon vorüber ist, oder erst sein wird [Huang, Chen et al. 2003].

Für die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 wurden durchschnittlich 5 Stunden Inkubationszeit vom Hersteller empfohlen. Diese Zeit ist jedoch nicht das genaue Optimum für jedes einzelne Zytokin. Unsere Studie beinhaltet einen vergleichsweise langen zeitlichen Ablauf. Dabei konnte nicht vermieden werden, dass im Laufe der Untersuchungen verschiedene Chargen der jeweiligen Hersteller für die benötigten Antikörper bezogen wurden. Daher kann es zu gewissen Schwankungen in der Markierung und somit der Zytokinexpressionsmessung gekommen sein.

Daneben finden sich verschiedene Allergenextrakte, die für die SLIT verwendet werden. Des Weiteren sind in einigen Studien Erwachsene, in anderen Kinder Gegenstand der Untersuchung.

Dosis und Dauer der Therapie

Die Dosis der verabreichten Allergene schwankt extrem (zwischen 5fach und mehrere 100fach verglichen mit der subkutanen Immuntherapie, deren Dosis auch jeweils schwankt). Aktuelle Richtlinien fordern eine Hoch-Dosis-Therapie der SLIT [Bousquet, Lockey et al. 1998; van Cauwenberge, Bachert et al. 2000]. Nach dem WHO-Positonspapier sollte die

kumulative Allergendosis 5 bis zu 20fach der Dosis der subkutanen SIT betragen [Bousquet, Lockey et al. 1998; van Cauwenberge, Bachert et al. 2000]. Im Gegensatz dazu liegt die empfohlene Dosis des kurzen Leitfadens (pocket guide) des ARIA-Expertenausschusses, der 2001 veröffentlicht wurde, bei der 50 bis 100fachen Dosis der subutanen Immuntherapie [Lockey 2001]. Daher ist es wünschenswert, dass die kumulative Dosis für die SLIT standardisiert in Mikrogramm eines Hauptallergens definiert wird, anstelle einer Vielzahl von Verhältnissen, die die Allergendosis der SLIT mit der Antigendosis verschiedener SCIT-Anwendungen vergleichen [Wessner, Rakoski et al. 2003].

Quirino et al. demonstrierten, dass mit einer 2,4fachen Dosis eine vergleichbare klinische Wirkung bei der SLIT zu finden ist [Quirino, Iemoli et al. 1996]. Auch Bernardis et al. zeigten, dass eine nur 4fach höhere Allergendosis in der SLIT eine vergleichbare Wirkung hat [Bernardis, Agnoletto et al. 1996]. Die Dauer der Immuntherapie ist ein anderer wichtiger Faktor, da das Muster der Zytokinproduktion zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich sein kann.

In den bisher vorliegenden Studien variiert die Dauer der Therapie zum Teil erheblich - von weniger als 6 Monaten bis mehrere Jahre. Die Empfehlungen gehen von einer 3 bis 5jährigen Therapie aus [Di Rienzo, Marcucci et al. 2003]. Desweiteren gibt es neue Behandlungsansätze, die mit einer sehr schnell aufbauenden Anfangsdosis beginnen und eine anschließende Erhaltungsdosis beinhalten. Auch dabei konnte eine gute Wirkung gezeigt werden [Voltolini, Modena et al. 2001; Zwacka G 2004]. Wie lange dieser Erfolg der Therapie anhält und in welchem Maße, ist aber noch völlig unklar.

Erkrankungen

Vor dem Beginn einer Immuntherapie müssen alle Begleiterkrankungen evaluiert und im Falle einer Beteiligung an einer Studie ausgeschlossen werden. Darüber hinaus gibt es aber Zustände, die mit einer veränderten Zytokinproduktion einhergehen können, die klinisch nicht oder nur schwer zu erkennen sind. Dazu gehören unter anderem kleinere Schürfwunden besonders bei Kindern, Infekte, die zu keiner klinischen Symptomatik führen, verdeckte Zahnprobleme oder zum Beispiel chronische Darmerkrankungen im Anfangsstadium.

Auch finden sich bei Allergikern häufig sogenannte minimale persistierende Entzündungen, die ein chronisches Stadium der allergischen Entzündung der nasalen Mukosa darstellen und mit einem pathologischen Zytokinmuster einhergehen können [Ricca, Landi et al. 2000].

Der Zeitpunkt der Blutentnahme ist darüber hinaus noch ein weiterer wichtiger Faktor. Bei Pollenallergikern findet sich eine saisonal abhängige Pollenbelastung, die zu einer

Exazerbation der Erkrankung führen kann und auch ohne begleitende Symptomatik eine deutliche Verschiebung im Zytokinmuster dieser Patienten mit sich bringt [Wosinska-Becler, Plewako et al. 2004].

Beim Vergleich der Pollenflugdaten aus dem Großraum Jena/Weimar wurden Schwankungen innerhalb des Untersuchungszeitraumes, sowohl für den Zeitpunkt der höchsten Belastung als auch die mittlere jährliche Pollenmenge pro m³ Luft, beobachtet [Andrea Koch 2000]. Dies kann sich, wenn auch darauf geachtet wurde, dass die Blutentnahmen außerhalb der Pollenflugsaison abgenommen wurden, in einer Veränderung des Zytokinprofiles deutlich machen. Weiterhin kann die Allergenvermeidung bei zum Beispiel Hausstaubmilbenallergikern durch Milben undurchlässige Matratzenbezüge (Encasing), veränderte Reinigungsregimes und Desinfektionsmittel zu einer erheblichen Reduzierung der Allergenbelastung mit Symptomabnahme führen und mit einer möglichen Zytokinverschiebung einhergehen [Halken, Host et al. 2003].

5.7 Allergie - Spezifische oder unspezifische Erkrankung?

In unseren Untersuchungen wurden die Lymphozyten der Allergiker und Kontrollen unspezifisch stimuliert. Der Sinn dieser Vorgehensweise könnte angezweifelt werden, da es sich bei einer allergischen Reaktion um eine *Allergen-spezifische* Reaktion handelt. Es ist daher auf jeden Fall sinnvoll, Allergen-induzierte Reaktionen bei Allergikern in Zusammenhang mit dem Verlauf von Immuntherapien zu untersuchen. Einige Tests, wie z.B. der CAST, werden bereits kommerziell angeboten, aber ihre Aussagekraft wird noch konträr diskutiert [Santos, Carlos et al. 2002]. Mit derartigen Tests wird konkret die Funktion nur der spezifisch auf das Allergen reagierenden Zellen untersucht. So kann z.B. deren Zahl im Vergleich zur Lymphozytengesamtzahl gemessen werden oder auch deren Phänotyp oder Interleukinprofil bestimmt werden. Die Zahl dieser Zellen ist im Verhältnis zur Gesamtzahl der Lymphozyten relativ gering (ca. 1:10.000 bis 1:100.000). Hierdurch ist der Messaufwand relativ groß und eine große Genauigkeit der Tests ist erforderlich. Eine Alternative hierzu ist, den Phänotyp und das Interleukin-Profil der Gesamtlymphozyten zu untersuchen. Dieser Methode liegt die Annahme zu Grunde, dass es sich bei der Allergie um eine nicht spezifische Erscheinung handelt, sondern, dass sie mit einer generellen immunologischen Veränderung einhergeht, die sich in einem verschobenen Th1/Th2-Gleichgewicht widerspiegelt. Hierfür sprechen z.B. die Beobachtungen, dass sich nicht die konkreten Allergien vererben oder von der Mutter in der Schwangerschaft übertragen werden, sondern nur die allgemeine Prädisposition für allergische Erkrankungen irgendeiner Spezifität weitergegeben werden [Uthoff, Spenner et al. 2003]. Auch die etablierte Beobachtung, dass Allergiker eher weitere Allergien entwickeln als Nicht-Allergiker spricht für ein unspezifisches Phänomen, wie wir es auch in der vorliegenden Arbeit finden konnten .

Tab.5.1: Doppelblinde und Placebo kontrollierte SLIT-Studien: Hausstaubmilbe
modifiziert nach Morris DL [Morris, Kroker et al. 2003]

Referenz	Patienten- anzahl	Erkrankung und Dauer der Therapie	Erhaltungsdosis/Monat	Ergebnisse p<0,05	Neben- wirkungen (Anzahl)
Marucci et al.	30 aktive 20 Kontrollen Kinder	saisonale allergische Rhinitis 7 Monate	7,5 µg	keine	keine
Di Rienzo et al.	48 Kinder 5-12 Jahre alt 4 Gruppen	Rhinokonjunktivitis 5 1/2 Monate	Gruppe A: 9,1 µg Gruppe B: 9,1 µg Gruppe C: 6,5 µg	Symptomatik in den 3 aktiven Gruppen ↓	milde Ödem (2) Augenlidödem (2)
Hordijk et al.	27 aktive 30 Placebo	Rhinitis, Konjunktivitis 10 Monate	82,327 BU (biological unit)	Symptomatik ↓	geringe lokale Symptomatik
Clavel et al.	62 aktive 58 Placebo	Rhinitis, Konjunktivitis 6 Monate	576 µg Phl p 5	Symptomatik ↓	oraler Pruritus keuchende Atmung (einige)
Gozalo et al.	35 aktive 19 Kontrollen im 1. Jahr 42 aktive	saisonale Rhino- konjunktivitis 7 Monate im 1. Jahr 12 Monate im 2. Jahr	81,24 BU	Symptomatik ↓	2,7 % Gabe von Antihistaminika
Quirino et al.	10 aktive 10 Placebo	saisonale Rhinitis 12 Monate in SLIT/SCIT aufgeteilt	SLIT: 81,2 BU SCIT: 34,3 BU	Symptomatik ↓ Medikationsgebrauch ↓	keine
Feliziani et al.	18 aktive 16 Placebo	okulare Rhinitis 3,5-4 Monate	260 BU	Symptomatik ↓	keine
Pradalier et al.	62 aktive 16 Placebo	okulare Symptomatik Rhinitis, Asthma 4,5 Monate	255 µg Phl P 5	okulare Symptomatik ↓ Asthmasymptomatik ↓	geringe

Fortsetzung Tab.5.1: Doppelblinde und Placebo kontrollierte SLIT-Studien:
 Hausstaubmilbe modifiziert nach Morris DL
 [Morris, Kroker et al. 2003]

Referenz	Patienten- anzahl	Erkrankung und Dauer der Therapie	Erhaltungs- dosis/Monat	Ergebnisse p<0,05	Neben- wirkungen (Anzahl)
Mungan et al.	5 aktive 11 Placebo	Rhinitis, Asthma, 12 Monate	867 IR (index of reactivity)	Medikamentengebrauch ↓ Symptomatik ↓ IgG4 nach 12 Monaten ↑	bukkaler Pruritus (1)
Tari et al.	30 aktive 28 Placebo Kinder	Rhinitis, Asthma, 24 Monate	4,875 STU (standard unit)	IgG4 nach 18 Monaten ↑ IgG nach 12 Monaten ↑	keine
Bahceciler	8 aktive 7 Placebo Kinder	Rhinitis, Asthma 5 Monate	69,3 µg Der p 1 121,2 µg Der f 1	Asthmasymptomatik ↓ Medikamentengebrauch ↓ EFP ↑ Skin Prick Test ↓	keine
Pajno et al.	12 aktive 12 Placebo Kinder	Asthma 24 Monate	10,4 µg Der p 1 5,2 µg Der f 1	Medikamentengebrauch nach 2 Jahren ↓ Symptomatik ↔	Müdigkeit (4) Lippenschwellung (1) oraler Pruritus (1)
Tari et al.	30 aktive 28 Placebo	Rhinitis, Asthma 24 Monate	4,875 STU	Skin Prick Test ↓ Symptomatik ↓ Medikationsgebrauch ↓ spez. IgG ↑	Urtikaria (3) leichte Asthmasymptomatik (8) oraler Pruritus (2) gastrointestinale Beschwerden (4) oraler Pruritus (2)
Guez et al.	36 aktive 36 Placebo	Rhinitis 24 Monate	187 µg Der p 1 144,2 µg Der f 1	keine signifikanten Veränderungen	
Bousquet et al.	42 aktive 43 Placebo	Rhinitis, Asthma 24 Monate	309,6 µg Der p 1 541,8 µg Der f 1	Rhinitissymptomatik ↓ IgG4 ↑	Urtikaria (3) Juckreiz im Rachen (3) Asthmasymptomatik (1)

6. Zusammenfassung

Die Inzidenz der Allergien hat in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen. In der Behandlung allergischer Erkrankungen spielt die spezifische Immuntherapie als derzeit einzige kausale Methode der Behandlung in Kombination mit der Pharmakotherapie die zentrale Rolle. Mit der sublingualen Immuntherapie wurde eine Alternative zur subkutanen Immuntherapie entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels FACS-Untersuchung nach unspezifischer Stimulierung die intrazelluläre Konzentration von CD154 sowie der Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 in isolierten T-Zellen aus dem Blut allergischer Kinder vor und während sublingualer Immuntherapie in einer offenen Anwendungsbeobachtung bestimmt. Insgesamt wurden 92 Blutproben von 48 allergischen Kindern (21 Milben-, 20 Gräser- und 7 Frühblüherallergiker) und 44 gesunden Kontrollen untersucht. Das Durchschnittsalter lag bei 13 Jahren.

Anhand der untersuchten Zytokine konnten zum Teil immunologische Effekte der Therapie gezeigt werden. Die gesamte Allergikergruppe vor Therapie zeigte im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere Werte für die CD154 Expression. Unter Therapie kam es zu einer Abnahme der Werte auf das Normalniveau. Die unbehandelten Allergiker zeigten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen leicht erhöhte IFN- γ Werte, die nach 2 bis 3 jähriger Therapie weiter anstiegen, jedoch ohne Signifikanz. Bei Betrachtung der gesamten Allergiegruppe nahm die intrazelluläre IL-10 Expression unter Therapie signifikant zu. Die IL-2 Expression zeigte initial eine Abnahme, unter SLIT kam es zu einem signifikanten Anstieg bei Betrachtung der gesamten Allergikergruppe. Bei den Gräser- und Milbenallergikern kam es zu einem Anstieg der Expression von IL-4 nach zwei bis dreijähriger Therapie, so dass sich insgesamt unter Therapie keine Änderung des Th1/Th2-Verhältnisses mit der hier angewandten Methodik ergab. Die Symptomatik der Patienten hat sich unter Therapie nach Angaben des behandelnden Klinikern deutlich verbessert.

Die verminderte Expression von CD154 sowie die erhöhte Expression von IL-10 könnten eine wichtige Rolle für die Verbesserung der klinischen Symptomatik spielen. CD154 ist neben anderen Molekülen entscheidend am Immunglobulinklassenwechsel zur Produktion von IgE beteiligt. IL-10 hat wichtige immunregulatorische/-inhibitorische Fähigkeiten, die zu einer Anergie gegenüber einem Allergen führen können. Der parallele Anstieg von Th1- und Th2-

Interleukinen deutet an, dass nicht das Verhältnis der beiden zueinander, sondern die Stärke der Th1-Antwort mit der klinischen Symptomatik der Patienten korreliert. Über die hier untersuchten Parameter hinaus erscheint die Induktion einer oralen Toleranz über dendritische Zellen auf einer schon früheren Stufe von Bedeutung.

Aufgrund der relativ großen Schwankungsbreite der untersuchten Parameter haben diese für den Therapieverlauf des individuellen Patienten keine Vorhersagekraft, aber einzelne Parameter (CD154, IL-10) erscheinen geeignet, um immunologische Effekte der sublingualen Immuntherapie in einer Gruppe darzustellen.

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit anhand einer Anwendungsbeobachtung eine Beeinflussung immunologischer Parameter und eine klinische Besserung durch sublinguale Immuntherapie bei Kindern mit Inhalationsallergien.

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.2: Darstellung Th1-Th2-System .Harber M et al., Cambridge University Press, 2000

Abb. 3.1: Dosierungsschema Pangramin®

Abb. 3.5: Ficoll-Gradient

Abb. 3.6: MACS (Miltenyi Biotech)

Abb. 3.7.1: Schema zur Stimulation der isolierten T-Zellen

Abb. 3.7.2: Schema der intrazellulären Färbung

Abb. 3.7.3: Beispielhafte Darstellung verschiedener Lymphozytenpopulationen im Vollblut

Abb. 4.1: Pat. 364, Darstellung der IFN- γ Expression

Abb. 4.2: Pat. 364, Darstellung der IFN- γ Expression

Abb. 4.3: Pat. 422, Darstellung der IL-2 Expression

Abb. 4.4: Pat. 422, Darstellung der IL-2 Expression

Abb. 4.2.1: CD154, gesamte Allergiegruppe

Abb. 4.2.1: Milbe, CD 154

Abb. 4.2.2: Gräser, CD 154

Abb. 4.2.3: Frühblüher, CD 154

Abb. 4.3.1: IFN- γ , gesamte Allergiegruppe

Abb. 4.3.2: Milbe, IFN- γ

Abb. 4.3.3: Gräser, IFN- γ

Abb. 4.3.4: Frühblüher, IFN- γ

Abb. 4.4.1: IL-2, gesamte Allergiegruppe

Abb. 4.4.2: Milbe, IL-2

Abb. 4.4.3: Gräser, IL-2

Abb. 4.4.4: Frühblüher, IL-2

Abb. 4.5.1: IL-4, gesamte Allergiegruppe

Abb. 4.5.2: Milbe, IL-4

Abb. 4.5.3: Gräser, IL-4

Abb. 4.5.4: Frühblüher, IL-4

Abb. 4.6.1: IL-10, gesamte Allergiegruppe

Abb. 4.6.2: Milbe, IL-10

Abb. 4.6.3: Gräser, IL-10

Abb. 4.6.4: Frühblüher, IL-10

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.2:	Irrtumswahrscheinlichkeiten CD154
Tab. 4.3:	Irrtumswahrscheinlichkeiten IFN- γ
Tab. 4.4:	Irrtumswahrscheinlichkeiten IL-2
Tab. 4.5:	Irrtumswahrscheinlichkeiten IL-4
Tab. 4.6:	Irrtumswahrscheinlichkeiten IL-10
Tab.5.1:	Doppelblinde und Placebo kontrollierte SLIT-Studien: Hausstaubmilbe modifiziert nach Morris DL [Morris, Kroker et al. 2003]

Literaturverzeichnis

- Abramson, M., R. Puy, et al. (1999). "Immunotherapy in asthma: an updated systematic review." Allergy **54**(10): 1022-41.
- Akdis, C. A. and K. Blaser (1999). "IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy." Faseb J **13**(6): 603-9.
- Akdis, C. A. and K. Blaser (2000). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." Allergy **55**(6): 522-30.
- Akdis, C. A., T. Blesken, et al. (1998). "Role of interleukin 10 in specific immunotherapy." J Clin Invest **102**(1): 98-106.
- Andrea Koch, A. f. R. F. J. (2000). "Pollenflugdaten."
- Ariano, R., R. C. Panzani, et al. (1998). "Efficacy and safety of oral immunotherapy in respiratory allergy to *Parietaria judaica* pollen. A double-blind study." J Investig Allergol Clin Immunol **8**(3): 155-60.
- Aruffo, A., M. Farrington, et al. (1993). "The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome." Cell **72**(2): 291-300.
- Bacharier, L. B., H. Jabara, et al. (1998). "Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation." Int Arch Allergy Immunol **115**(4): 257-69.
- Bagnasco, M., G. Mariani, et al. (1997). "Absorption and distribution kinetics of the major *Parietaria judaica* allergen (Par j 1) administered by noninjectable routes in healthy human beings." J Allergy Clin Immunol **100**(1): 122-9.
- Bagnasco, M., G. Passalacqua, et al. (2001). "Pharmacokinetics of an allergen and a monomeric allergoid for oromucosal immunotherapy in allergic volunteers." Clin Exp Allergy **31**(1): 54-60.
- Bahceciler, N. N., U. Isik, et al. (2001). "Efficacy of sublingual immunotherapy in children with asthma and rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study." Pediatr Pulmonol **32**(1): 49-55.
- Baldo, B. A. (1991). "Structural features of allergens large and small with emphasis on recombinant allergens." Curr Opin Immunol **3**(6): 841-50.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.

- Bär, C. (2001). "Vergleich der Interleukin- und CD154-Produktion in T-Zell-Kulturen aus dem Blut gesunder und allergischer Kinder vor und unter spezifischer sublingualer Immuntherapie." Dissertationsschrift.
- Baroody, F. M., P. Rouadi, et al. (1998). "Intranasal beclomethasone reduces allergen-induced symptoms and superficial mucosal eosinophilia without affecting submucosal inflammation." Am J Respir Crit Care Med **157**(3 Pt 1): 899-906.
- Behrendt, H., W. M. Becker, et al. (1997). "Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants." Int Arch Allergy Immunol **113**(1-3): 69-74.
- Bellinghausen, I., G. Metz, et al. (1997). "Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects." Eur J Immunol **27**(5): 1131-9.
- Benjaponpitak, S., A. Oro, et al. (1999). "The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **103**(3 Pt 1): 468-75.
- Bennett WA, L.-D. S., Whitworth NS, Brackin MN, Hale E, Cowan BD (1997). "Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance." Early Pregnancy **3**(3): 190-8.
- Bernardis, P., M. Agnoletto, et al. (1996). "Injective versus sublingual immunotherapy in *Alternaria tenuis* allergic patients." J Investig Allergol Clin Immunol **6**(1): 55-62.
- Bieber T, d. I. S. H., Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la Salle C (1992). "Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FceRI)." J Exp Med **175**(5): 1285-1290.
- Bjorksten B, D. D., Foucard T, Khetsuriani N, Khaitov R, Leja M, Lis G, Pekkanen J, Priftanji A, Riikjarv MA (1998). "Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe." EUR Respir J **12**(2): 432-437.
- Bousquet, J., R. Lockey, et al. (1998). "Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper." J Allergy Clin Immunol **102**(4 Pt 1): 558-62.
- Bousquet, J., P. Scheinmann, et al. (1999). "Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust mites: a double-blind, placebo-controlled study." Allergy **54**(3): 249-60.
- Braback, L., A. Breborowicz, et al. (1995). "Risk factors for respiratory symptoms and atopic sensitisation in the Baltic area." Arch Dis Child **72**(6): 487-93.

- Braun-Fahrlander, C., M. Gassner, et al. (1999). "Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution." Clin Exp Allergy **29**(1): 28-34.
- Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, et al. (2002). "Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children." N Engl J Med **347**(12): 869-77.
- Brown, J. L. and A. J. Frew (2001). "The efficacy of oromucosal immunotherapy in respiratory allergy." Clin Exp Allergy **31**(1): 8-10.
- Buckle, F. G. and A. B. Cohen (1975). "Nasal mucosal hyperpermeability to macromolecules in atopic rhinitis and extrinsic asthma." J Allergy Clin Immunol **55**(4): 213-21.
- Canonica, G. W. and G. Passalacqua (2003). "Noninjection routes for immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **111**(3): 437-48; quiz 449.
- Cardoso, M. R., S. N. Cousens, et al. (2004). "Crowding: risk factor or protective factor for lower respiratory disease in young children?" BMC Public Health **4**(1): 19.
- Chen, Y., J. Inobe, et al. (1995). "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance." Nature **376**(6536): 177-80.
- Clark, E. A. and J. A. Ledbetter (1994). "How B and T cells talk to each other." Nature **367**(6462): 425-8.
- Clavel, R., J. Bousquet, et al. (1998). "Clinical efficacy of sublingual-swallow immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled trial of a standardized five-grass-pollen extract in rhinitis." Allergy **53**(5): 493-8.
- Coka AF, C. R. (1923). "On the classification of the phenomena of hypersensitiveness." Immunol **8**: 163.
- Cookson, W. O. and M. F. Moffatt (1997). "Asthma: an epidemic in the absence of infection?" Science **275**(5296): 41-2.
- Cookson WOCM, S. P., Faux JA, Hopkin JM (1989). "Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q." Lancet **i**: 1292-1294.
- Coombs RRA, G. P. (1963). "The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical Aspects of Immunology." Clinical Aspects of Immunology: 317.
- Creticos, P. S., N. F. Adkinson, Jr., et al. (1985). "Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy." J Clin Invest **76**(6): 2247-53.
- Dale HH, L. P. (1910). "The physiologic action of beta-imidazoethylamine." Physiol (Land) **41**: 318.

- D'Ambrosio, F. P., L. Ricciardi, et al. (1996). "Rush sublingual immunotherapy in Parietaria allergic patients." Allergol Immunopathol (Madr) **24**(4): 146-51.
- De Amici, M., F. Puggioni, et al. (2001). "Variations in serum levels of interleukin (IL)-1beta, IL-2, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha during specific immunotherapy." Ann Allergy Asthma Immunol **86**(3): 311-3.
- De Vos, C., M. Joseph, et al. (1989). "Inhibition of human eosinophil chemotaxis and of the IgE-dependent stimulation of human blood platelets by cetirizine." Int Arch Allergy Appl Immunol **88**(1-2): 212-5.
- Del Prete, G. M., E. Pizzolo, G. Romagnani, S (1995). "CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link." Immunol Today **16**: 76-80.
- Des Roches A, P. A., Menardo JL, Bouges R, Daures JP, Bousquet J (1997). "Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides extract. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children." J Allergy Clin Immunol **99**: 450-453.
- Di Rienzo, V., F. Marcucci, et al. (2003). "Long-lasting effect of sublingual immunotherapy in children with asthma due to house dust mite: a 10-year prospective study." Clin Exp Allergy **33**(2): 206-10.
- Di Rienzo, V., P. Puccinelli, et al. (1999). "Grass pollen specific sublingual/swallow immunotherapy in children: open-controlled comparison among different treatment protocols." Allergol Immunopathol (Madr) **27**(3): 145-51.
- Dieli, F. (2003). "Dendritic cells and the handling of antigen." Clin Exp Immunol **134**(2): 178-80.
- Drachenberg, K. J., M. Heinzkill, et al. (2003). "Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents." Allergol Immunopathol (Madr) **31**(5): 270-7.
- Druce, H. M., S. Goldstein, et al. (1990). "Multicenter placebo-controlled study of nedocromil sodium 1% nasal solution in ragweed seasonal allergic rhinitis." Ann Allergy **65**(3): 212-6.
- Dumoutier, L., J. Louahed, et al. (2000). "Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9." J Immunol **164**(4): 1814-9.
- Durham, S. R., S. M. Walker, et al. (1999). "Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy." N Engl J Med **341**(7): 468-75.
- Durham, S. R., S. Ying, et al. (1996). "Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases

- the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma." J Allergy Clin Immunol **97**(6): 1356-65.
- Ebner, S., G. Ratzinger, et al. (2001). "Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4." J Immunol **166**(1): 633-41.
- Elsner, J., Forssmann U (2002). "Another renaissance of eosinophils in allergic diseases." ACI Int **14**: 151-5.
- Elsner, J. and A. Kapp (2001). "The chemokine network in eosinophil activation." Allergy Asthma Proc **22**(3): 139-48.
- Ernst, P. and Y. Cormier (2000). "Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm." Am J Respir Crit Care Med **161**(5): 1563-6.
- Falagiani, P. and G. Mistrello (1997). "Pharmacokinetics of allergens after local administration." Allergy **52**(33 Suppl): 17-21.
- Fang, W., K. A. Nath, et al. (1997). "CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating bcl-xL expression and blocking oxidant accumulation." Am J Physiol **272**(3 Pt 1): C950-6.
- Fanta, C., B. Bohle, et al. (1999). "Systemic immunological changes induced by administration of grass pollen allergens via the oral mucosa during sublingual immunotherapy." Int Arch Allergy Immunol **120**(3): 218-24.
- Freeman, J. (1911). "Further observations on the treatment of hay fever by hypodermic inoculation of pollen vaccine." Lancet **2**: 814-817.
- Friedman, A. and H. L. Weiner (1994). "Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6688-92.
- Fuleihan, R., N. Ramesh, et al. (1993). "Role of CD40-CD40-ligand interaction in Ig-isotype switching." Curr Opin Immunol **5**(6): 963-7.
- Gajewski, T. F. and F. W. Fitch (1988). "Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones." J Immunol **140**(12): 4245-52.
- Gehring S, S. M., van der Bosch J (1998). "A new in vitro model for studying human T cell differentiation: T(H1)/T(H2) induction following activation by superantigens." J Immunol Methods **219**: 85-98.
- Giovane, A. L., M. Bardare, et al. (1994). "A three-year double-blind placebo-controlled study with specific oral immunotherapy to Dermatophagoides: evidence of safety and efficacy in paediatric patients." Clin Exp Allergy **24**(1): 53-9.

- Gordon J, F.-R. L., Cairns JA, Millsam MJ, Lane PJ, Johnson CD, McLennon JC "CD23: A multi-functional receptor/lymphokine?" Immunol Today **10**: 153.
- Grabstein, K. H., C. R. Maliszewski, et al. (1993). "The regulation of T cell-dependent antibody formation in vitro by CD40 ligand and IL-2." J Immunol **150**(8 Pt 1): 3141-7.
- Greenberger, P. (1992). "Use of immunotherapy for allergic disorders. Diagnostic considerations and indications." Immunol Aller Clin North Am **12**: 1-12.
- Grzela, K., T. Grzela, et al. (2002). "Influence of allergen-specific immunotherapy on IL-4-dependent IL-12 production by monocytes." Int J Mol Med **10**(4): 481-4.
- Guez, S., C. Vatrinet, et al. (2000). "House-dust-mite sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in perennial rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study." Allergy **55**(4): 369-75.
- Halken, S., A. Host, et al. (2003). "Effect of mattress and pillow encasings on children with asthma and house dust mite allergy." J Allergy Clin Immunol **111**(1): 169-76.
- Hammad, H., A. S. Charbonnier, et al. (2001). "Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors." Blood **98**(4): 1135-41.
- Hasseus, B., U. Dahlgren, et al. (1995). "Antigen presenting capacity of Langerhans cells from rat oral epithelium." J Oral Pathol Med **24**(2): 56-60.
- Heppt W, R. H., Röcken M (1998). "Allergologie." Springer Verlag **KAPITEL 3**: 54-56.
- Hermes, B., M. Worm, et al. (1997). "Upregulation of CD40 and CD40 ligand expression in IgE-associated cutaneous diseases." Acta Derm Venereol **77**(6): 441-5.
- Hirata, H., T. Yukawa, et al. (1999). "[Effect of rush immunotherapy (RIT) on Hymenoptera allergy]." Arerugi **48**(12): 1331-6.
- Holm, A. F., W. J. Fokkens, et al. (1995). "Effect of 3 months' nasal steroid therapy on nasal T cells and Langerhans cells in patients suffering from allergic rhinitis." Allergy **50**(3): 204-9.
- Horak, F., P. Stubner, et al. (1998). "Immunotherapy with sublingual birch pollen extract. A short-term double-blind placebo study." J Investig Allergol Clin Immunol **8**(3): 165-71.
- Hordijk, G. J., J. B. Antvelink, et al. (1998). "Sublingual immunotherapy with a standardised grass pollen extract; a double-blind placebo-controlled study." Allergol Immunopathol (Madr) **26**(5): 234-40.
- Huang, J. L., L. C. Chen, et al. (2003). "TH1 and TH2 cytokine production among asthmatic children after immunotherapy." J Asthma **40**(3): 273-9.

- Illi, S., E. von Mutius, et al. (2001). "Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study." Bmj **322**(7283): 390-5.
- Ippoliti, F., W. De Santis, et al. (2003). "Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children." Pediatr Allergy Immunol **14**(3): 216-21.
- ISAAC (1998). "Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee." Lancet **351**(9111): 1225-32.
- Ishizaka K, I. T. (1966). "Physiochemical properties of reagenic antibody. Association of reagenic activity with an immunoglobulin other than IgA or IgG globulin." J Allergy **37**: 169.
- Ishizaka K, I. T., Hornbrook MM (1966). "Physiochemical properties of reagenic antibodies. V. Correlation of reagenic activity with gE-globulin antibody." J Immunol **97**: 840.
- Jakob, T. and M. C. Udey (1999). "Epidermal Langerhans cells: from neurons to nature's adjuvants." Adv Dermatol **14**: 209-58; discussion 259.
- Jarvis, B. and A. Markham (2000). "Montelukast: a review of its therapeutic potential in persistent asthma." Drugs **59**(4): 891-928.
- Jelinek, D. F. (2000). "Regulation of B lymphocyte differentiation." Ann Allergy Asthma Immunol **84**(4): 375-85; quiz 385-7.
- Johannson, S. (1967). "Raised levels of new immunoglobulin (IgND) in asthma." Lancet **2**: 951.
- Juliusson, S., F. Aldenborg, et al. (1995). "Proteinase content of mast cells of nasal mucosa; effects of natural allergen exposure and of local corticosteroid treatment." Allergy **50**(1): 15-22.
- Jung, T., U. Schauer, et al. (1993). "Detection of intracellular cytokines by flow cytometry." J Immunol Methods **159**(1-2): 197-207.
- Jutel, M., W. J. Pichler, et al. (1995). "Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures." J Immunol **154**(8): 4187-94.
- Kägi M. K., W. B. (2002). "Diffenet methods of local allergen-specific immunotherapy." Allergy **57**: 379-387.
- Kahlert, H., E. Grage-Griebenow, et al. (2000). "T cell reactivity with allergoids: influence of the type of APC." J Immunol **165**(4): 1807-15.
- Kaiser, H. B. (2004). "Risk factors in allergy/asthma." Allergy Asthma Proc **25**(1): 7-10.

- Kakinoki, Y., Y. Ohashi, et al. (2000). "Allergen induced mRNA expression of interleukin-5, but not of interleukin-4 and interferon-gamma, in peripheral blood mononuclear cells obtained before the pollen season predicts the clinical efficacy of immunotherapy for seasonal allergic rhinitis." Scand J Immunol **51**(2): 202-8.
- Kay, A. B. (2001). "Allergy and allergic diseases. First of two parts." N Engl J Med **344**(1): 30-7.
- Keskin, G., A. Inal, et al. (1999). "Serum IFN-gamma and IL-10 levels before and after specific immunotherapy in patients with allergic rhinitis." Allergol Immunopathol (Madr) **27**(5): 261-4.
- Khinchi, M. S., L. K. Poulsen, et al. (2004). "Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen-specific immunotherapy: a randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study." Allergy **59**(1): 45-53.
- Kilpelainen, M., E. O. Terho, et al. (2000). "Farm environment in childhood prevents the development of allergies." Clin Exp Allergy **30**(2): 201-8.
- Kjellman, N.-I. (1977). "Atopic disease in 7-year old children. Incidence in relation to family history." Acta Paediatr Scand **66**: 465-471.
- Kleine-Tebbe, J. F., Thomas; Klimek, Ludger; Kühr, Joachim; Kunkel, Gert; Lepp, Ute; Niggemann, Bodo; Rakoski, Jürgen; Renz, Harald; Saloga, Joachim; Simon, Jan (2003). "Spezifische Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Atemwegserkrankungen." Deutsches Ärzteblatt **100**(6): A-334 / B-296 / C-284.
- Klimek, L., A. B. Reske-Kunz, et al. (1999). "[Theories on the mode of action of desensitization]." Wien Med Wochenschr **149**(14-15): 415-20.
- Kreuzkamp, B. (2004). "Dendritische Zellen und orale Toleranz." Allergo Journal **6**: 3-4.
- Kripke ML, M. C., Jeevan A, Tang JM, Bucana C (1990). "Evidence that cutaneous antigen presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization." J Immunol **145**: 2833-2838.
- Kurz, H. and J. Riedler (2003). "[An increase in allergic diseases in childhood--current hypotheses and possible prevention]." Wien Med Wochenschr **153**(3-4): 50-8.
- La Rosa, M., C. Ranno, et al. (1999). "Double-blind placebo-controlled evaluation of sublingual-swallow immunotherapy with standardized *Parietaria judaica* extract in children with allergic rhinoconjunctivitis." J Allergy Clin Immunol **104**(2 Pt 1): 425-32.

- Lack, G., H. S. Nelson, et al. (1997). "Rush immunotherapy results in allergen-specific alterations in lymphocyte function and interferon-gamma production in CD4+ T cells." J Allergy Clin Immunol **99**(4): 530-8.
- Lambrecht, B. N. (2001). "Allergen uptake and presentation by dendritic cells." Curr Opin Allergy Clin Immunol **1**(1): 51-9.
- Lane, P., A. Traunecker, et al. (1992). "Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes." Eur J Immunol **22**(10): 2573-8.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2001). "IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." J Immunol **166**(9): 5530-9.
- Levy, F., C. Kristofic, et al. (1997). "Role of IL-13 in CD4 T cell-dependent IgE production in atopy." Int Arch Allergy Immunol **112**(1): 49-58.
- Lima, M. T., D. Wilson, et al. (2002). "Grass pollen sublingual immunotherapy for seasonal rhinoconjunctivitis: a randomized controlled trial." Clin Exp Allergy **32**(4): 507-14.
- Liu, Y. J., D. E. Joshua, et al. (1989). "Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres." Nature **342**(6252): 929-31.
- Liu, Y. J., D. Y. Mason, et al. (1991). "Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis." Eur J Immunol **21**(8): 1905-10.
- Lockey, R. F. (2001). "'ARIA': global guidelines and new forms of allergen immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **108**(4): 497-9.
- Lowenstein, H. (1980). "Timothy pollen allergens." ALLERGY **35**: 188-191.
- Lowenstein, H. (1995). "Spezifische Immuntherapie bei Typ-I-Allergien." HNO-Nachrichten **25**(4): 2-3.
- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, et al. (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." J Immunol **154**(10): 5071-9.
- Maggi E, P. P., Manetti R (1992). "Reciprocal regulatory effects of IFN-g and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones." J Immunol **148**: 2142-2147.
- Majori, M., A. Caminati, et al. (2000). "T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mite-sensitive asthma." Clin Exp Allergy **30**(3): 341-7.
- Malling, H. J. (1998). "Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment." Allergy **53**(5): 461-72.
- Marsh DG, N. J., Breazeale DR, Ghosh B, Friedhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH (1994). "Linkage analysis of IL4 and other chromosome

- 5q31.1 markers and total immunoglobulin E concentration." Natur Genetics **264**: 1152-1156.
- Marshall, J. D., H. Secrist, et al. (1995). "IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4+ T lymphocytes." J Immunol **155**(1): 111-7.
- Matricardi, P. M. (1997). "Infections preventing atopy: facts and new questions." Allergy **52**(9): 879-82.
- Milgrom, H., W. Berger, et al. (2001). "Treatment of childhood asthma with anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab)." Pediatrics **108**(2): E36.
- Morgan, A. J. and R. Jacob (1994). "Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane." Biochem J **300 (Pt 3)**: 665-72.
- Morris, D. L., G. F. Kroker, et al. (2003). "Local immunotherapy in allergy." Chem Immunol Allergy **82**: 1-10.
- Mosman TR, S. S. (1996). "The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunol Today **16**: 380-383.
- Moverare, R., L. Elfman, et al. (2000). "Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells following birch-pollen immunotherapy." Immunol Lett **73**(1): 51-6.
- Mueller, D. L., M. K. Jenkins, et al. (1990). "An intracellular calcium increase and protein kinase C activation fail to initiate T cell proliferation in the absence of a costimulatory signal." J Immunol **144**(10): 3701-9.
- Muijsers, R. B. and S. Noble (2002). "Spotlight on montelukast in asthma in children 2 to 14 years of age." Am J Respir Med **1**(3): 225-8.
- Mungan, D., Z. Misirligil, et al. (1999). "Comparison of the efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite-sensitive patients with rhinitis and asthma--a placebo controlled study." Ann Allergy Asthma Immunol **82**(5): 485-90.
- Nabe, M., D. K. Agrawal, et al. (1989). "Inhibitory effect of terfenadine on mediator release from human blood basophils and eosinophils." Clin Exp Allergy **19**(5): 515-20.
- Nakstad, B., H. Kahler, et al. (1999). "Allergen-stimulated expression of CD154 (CD40 ligand) on CD3+ lymphocytes in atopic, but not in nonatopic individuals. Modulation by bacterial lipopolysaccharide." Allergy **54**(7): 722-9.
- Nayak, A. (2004). "A review of montelukast in the treatment of asthma and allergic rhinitis." Expert Opin Pharmacother **5**(3): 679-86.

- Niess, J. (2001). "Analyse der Interleukin-induzierten Immunglobulin-Produktion in B-Zell-Kulturen aus dem Blut allergischer Kinder unter sublingualer und subkutaner spezifischer Immuntherapie." Dissertationsschrift.
- Niess JH, B. C., Nuske K, Vogelsang H, Schlenvoigt G, Heusser C, Junker U, Zwacka G, Markert UR (2000). "Immunglobulin-Klassen-Switch im CD40-B-Zell-Kultursystem durch die Interleukine IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 und IL-13." Allergologie **23**: 116-121.
- Nimmagadda SR, E. R. r. (1999). "Allergy: etiology and epidemiology." Pediatr Rev **20**: 111-115.
- Noelle, R. J., M. Roy, et al. (1992). "A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6550-4.
- Noon, L. (1911). "Prophylactic inoculation against hay fever." Lancet **1**: 1572-1573.
- Nouri-Aria, K. T., P. A. Wachholz, et al. (2004). "Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity." J Immunol **172**(5): 3252-9.
- Novak, N., R. Valenta, et al. (2004). "FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro." J Allergy Clin Immunol **113**(5): 949-57.
- Nucera, E., D. Schiavino, et al. (2000). "Immunological aspects of oral desensitization in food allergy." Dig Dis Sci **45**(3): 637-41.
- Orgel, H. A., E. O. Meltzer, et al. (1991). "Comparison of intranasal cromolyn sodium, 4%, and oral terfenadine for allergic rhinitis: symptoms, nasal cytology, nasal ciliary clearance, and rhinomanometry." Ann Allergy **66**(3): 237-44.
- Otsuka, H., A. Mezawa, et al. (1991). "Changes in nasal metachromatic cells during allergen immunotherapy." Clin Exp Allergy **21**(1): 115-9.
- Pajno, G. B., G. Barberio, et al. (2001). "Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study." Clin Exp Allergy **31**(9): 1392-7.
- Pajno, G. B., L. Morabito, et al. (2000). "Clinical and immunologic effects of long-term sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, placebo-controlled study." Allergy **55**(9): 842-9.

- Parronchi, P., D. Macchia, et al. (1991). "Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4538-42.
- Parronchi P, M. S., Sampognaro S, Giannarini L, Wahn U, Chong P, Maggi E, Renz H, Romagnani S (1996). "Effects of interferon-alpha on cytokine profile, T cell receptor repertoire and peptide reactivity of human allergen-specific T cells." Eur J Immunol **26**: 697-703.
- Passalacqua, G., M. Albano, et al. (1999). "Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to *Parietaria* species: A double-blind, placebo-controlled trial." J Allergy Clin Immunol **104**(5): 964-8.
- Passalacqua, G., S. Venturi, et al. (1999). "Oral and sublingual immunotherapy: general aspects and critical considerations." Wien Med Wochenschr **149**(14-15): 433-7.
- Patriarca, G., D. Schiavino, et al. (1998). "Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitization." Hepatogastroenterology **45**(19): 52-8.
- Peebles, R. S., Jr. (2004). "Viral infections, atopy, and asthma: is there a causal relationship?" J Allergy Clin Immunol **113**(1 Suppl): S15-8.
- Pierkes, M., I. Bellinghausen, et al. (1999). "Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells." J Allergy Clin Immunol **103**(2 Pt 1): 326-32.
- Pirquet, C. (1906). "Allergie." Münch Med Wschr **30**:1457.
- Poulsen K, R. C., Bindslev-Jensen C, Hansen MB, Bendtzen K (1995). "Biomolecular regulation of the IgE-response." Int Arch Immunol **106**: 55-61.
- Pradaliere, A., D. Basset, et al. (1999). "Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) with a standardized five-grass-pollen extract (drops and sublingual tablets) versus placebo in seasonal rhinitis." Allergy **54**(8): 819-28.
- Prausnitz C, K. H. (1921). "Studien über die Überempfindlichkeit." Int J Med Microbiol **86**: 160.
- Purello-D'Ambrosio, F., S. Gangemi, et al. (2001). "Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study." Clin Exp Allergy **31**(8): 1295-302.
- Quirino, T., E. Iemoli, et al. (1996). "Sublingual versus injective immunotherapy in grass pollen allergic patients: a double blind (double dummy) study." Clin Exp Allergy **26**(11): 1253-61.

- Raz, E., H. Tighe, et al. (1996). "Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 5141-5.
- Reich, M. (2001). "Vergleich von löslichen Plasmaproteinen bei Allergikern und Gesunden sowie während sublingualer oder subkutaner Immuntherapie." Dissertationsschrift.
- Reiss, M. (1997). "[Allergic rhinitis--is allergen elimination a useful form of therapy?]." Wien Med Wochenschr **147**(14): 328-32.
- Renshaw, B. R., W. C. Fanslow, 3rd, et al. (1994). "Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice." J Exp Med **180**(5): 1889-900.
- Ricca, V., M. Landi, et al. (2000). "Minimal persistent inflammation is also present in patients with seasonal allergic rhinitis." J Allergy Clin Immunol **105**(1 Pt 1): 54-7.
- Ring, J., T. Fuchs, et al. (2000). "Weißbuch der Allergie Deutschland."
- Robinson, D. S., Q. Hamid, et al. (1992). "Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma." N Engl J Med **326**(5): 298-304.
- Rocklin, R. E., A. L. Sheffer, et al. (1980). "Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization." N Engl J Med **302**(22): 1213-9.
- Romagnani, S. (1992). "Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology." Int Arch Allergy Immunol **98**(4): 279-85.
- Romagnani S, P. P., D'Elia MM, Romagnani P, Annunzinto F, Piccini MP, Maretti R, Sampognaro S, Mavillia C, De Carli M, Maggi E, Del Prete GF (1997). "An update on human Th1 and Th2 cells." Int Arch Allergy Immunol **113**: 153-156.
- Ross, R. N., H. S. Nelson, et al. (2000). "Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies." Clin Ther **22**(3): 342-50.
- Rousset, F., E. Garcia, et al. (1991). "Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen." J Exp Med **173**(3): 705-10.
- Sabbah, A., S. Hassoun, et al. (1994). "A double-blind, placebo-controlled trial by the sublingual route of immunotherapy with a standardized grass pollen extract." Allergy **49**(5): 309-13.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1999). "Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation." J Exp Med **189**(4): 611-4.

- Santos, M. C., M. L. Carlos, et al. (2002). "Laboratory diagnosis of hymenoptera venom allergy: comparative study between specific IgE, western blot and allergen leukocyte stimulation (CAST)." Allerg Immunol (Paris) **34**(1): 6-9.
- Sanz ML, P. I., Garcia BE, Oehling A (1996). "Diagnostic reliability considerations of specific IgE determination." J Investig Allergol Clin Immunol **6**: 152-161.
- Schandene, L., C. Alonso-Vega, et al. (1994). "B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10." J Immunol **152**(9): 4368-74.
- Shirakawa, T., T. Enomoto, et al. (1997). "The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder." Science **275**(5296): 77-9.
- Siegmund, R., H. Vogelsang, et al. (2000). "Surface membrane antigen alteration on blood basophils in patients with Hymenoptera venom allergy under immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **106**(6): 1190-5.
- Soler, M., J. Matz, et al. (2001). "The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics." Eur Respir J **18**(2): 254-61.
- Tari, M. G., M. Mancino, et al. (1990). "Efficacy of sublingual immunotherapy in patients with rhinitis and asthma due to house dust mite. A double-blind study." Allergol Immunopathol (Madr) **18**(5): 277-84.
- Taytard, A., D. Beaumont, et al. (1987). "Treatment of bronchial asthma with terfenadine; a randomized controlled trial." Br J Clin Pharmacol **24**(6): 743-6.
- Tazaki, T., K. Minoguchi, et al. (2004). "Allergen rush immunotherapy increases interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta2 chain expression in patients with allergic asthma." Cell Immunol **228**(1): 20-6.
- Tomasi, T. B., Jr. (1980). "Oral tolerance." Transplantation **29**(5): 353-6.
- Torres, J. P., GP; Ximenez C, Munoz L, Camorlinga-Ponce M, Ramos F, Gomez A, Munoz O (2003). "The association of intestinal parasitosis and H. pylori infection in children and adults from a Mexican community with high prevalence of parasitosis." Helicobacter **8**(3): 179-185.
- Trigg, C. J. and R. J. Davies (1996). "Local antihistamines." Clin Exp Allergy **26**(10): 1108-11.
- Troise, C., S. Voltolini, et al. (1995). "Sublingual immunotherapy in Parietaria pollen-induced rhinitis: a double-blind study." J Investig Allergol Clin Immunol **5**(1): 25-30.
- Uthoff, H., A. Spenner, et al. (2003). "Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates." J Immunol **171**(7): 3485-92.

- van Cauwenberge, P., C. Bachert, et al. (2000). "Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. European Academy of Allergology and Clinical Immunology." Allergy **55**(2): 116-34.
- Van der Pouw Kraan, T. C., J. S. Van der Zee, et al. (1998). "The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients." Clin Exp Immunol **111**(1): 129-35.
- van der Zwan, J. C., J. Flinterman, et al. (1983). "Hyposensitisation to wasp venom in six hours." Br Med J (Clin Res Ed) **287**(6402): 1329-31.
- Van Deusen, M. A., B. L. Angelini, et al. (1997). "Efficacy and safety of oral immunotherapy with short ragweed extract." Ann Allergy Asthma Immunol **78**(6): 573-80.
- Van Wilsem, E. J., I. M. Van Hoogstraten, et al. (1994). "Dendritic cells of the oral mucosa and the induction of oral tolerance. A local affair." Immunology **83**(1): 128-32.
- Varney VA, G. M., Frew AJ, Aber VR, Kay AB, Durham SR (1991). "Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs." Br Med J **302**: 265-269.
- Varney, V. A., Q. A. Hamid, et al. (1993). "Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses." J Clin Invest **92**(2): 644-51.
- Voltolini, S., P. Modena, et al. (2001). "Sublingual immunotherapy in tree pollen allergy. Double-blind, placebo-controlled study with a biologically standardised extract of three pollens (alder, birch and hazel) administered by a rush schedule." Allergol Immunopathol (Madr) **29**(4): 103-10.
- von Bubnoff, D., R. Fimmers, et al. (2004). "Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure." Clin Exp Allergy **34**(7): 1056-63.
- Von Ehrenstein, O. S., E. Von Mutius, et al. (2000). "Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers." Clin Exp Allergy **30**(2): 187-93.
- von Mutius, E., F. D. Martinez, et al. (1994). "Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany." Am J Respir Crit Care Med **149**(2 Pt 1): 358-64.
- von Mutius, E., S. K. Weiland, et al. (1998). "Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany." Lancet **351**(9106): 862-6.
- Vourdas, D., E. Syrigou, et al. (1998). "Double-blind, placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized olive pollen extract in pediatric patients with allergic rhinoconjunctivitis and mild asthma due to olive pollen sensitization." Allergy **53**(7): 662-72.

- Wahn U, S. C., Lind P, Lowenstein H (1988). "Prospective study on immunologic changes induced by two different Dermatophagoides pteronyssinus extracts prepared from whole mite culture and mite bodies." J Allergy Clin Immunol **82**: 360-370.
- Wang, P., P. Wu, et al. (1994). "IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells." J Immunol **153**(2): 811-6.
- Weiner, H. L. (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells." Microbes Infect **3**(11): 947-54.
- Wessner, D., J. Rakoski, et al. (2003). "Efficacy of sublingual immunotherapy in grass pollen allergy." Chem Immunol Allergy **82**: 53-61.
- Wheeler, A. W., J. S. Marshall, et al. (2001). "A Th1-inducing adjuvant, MPL, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines." Int Arch Allergy Immunol **126**(2): 135-9.
- White, M. V., J. E. Slater, et al. (1987). "Histamine and asthma." Am Rev Respir Dis **135**(5): 1165-76.
- WHO/IUS, A. N. S. (1995). "Allergen nomenclature." Clin Exp Allergy **25**: 27-37.
- WHO-Position-Paper (1998). "Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases." Allergy **53 Suppl 44**: 6.
- Wiedermann, U. (2003). "Mucosal immunity--mucosal tolerance. A strategy for treatment of allergic diseases." Chem Immunol Allergy **82**: 11-24.
- Wierenga, E. A., M. Snoek, et al. (1990). "Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients." J Immunol **144**(12): 4651-6.
- Williams, H., C. Robertson, et al. (1999). "Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood." J Allergy Clin Immunol **103**(1 Pt 1): 125-38.
- Wilson, D. R., A. M. Irani, et al. (2001). "Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium." Clin Exp Allergy **31**(11): 1705-13.
- Wingett, D. and C. P. Nielson (2003). "Divergence in NK cell and cyclic AMP regulation of T cell CD40L expression in asthmatic subjects." J Leukoc Biol **74**(4): 531-41.
- Wong, C. K., C. Y. Ho, et al. (2001). "Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma." Clin Exp Immunol **125**(2): 177-83.
- Worm, M. and B. M. Henz (1997). "Molecular regulation of human IgE synthesis." J Mol Med **75**(6): 440-7.

- Wosinska-Becler, K., H. Plewako, et al. (2004). "Cytokine production in peripheral blood cells during and outside the pollen season in birch-allergic patients and non-allergic controls." Clin Exp Allergy **34**(1): 123-30.
- Yoshimoto T, B. A., Watson C, Hu-Li J, Paul WE (1995). "Role of NK1.1+T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production." Science **270**: 1845-1847.
- Zuany-Amorim, C., C. Creminon, et al. (1996). "Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4+ T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity." J Immunol **157**(1): 377-84.
- Zwacka G, S. B., Markert UR (2004). "Erfahrungsbericht zur Verträglichkeit der Ultra-Rush-Anwendung der sublingualen Immuntherapie." submitted abstract.

Danksagung

Herrn PD. Dr. med. U.R. Markert danke ich für die Überlassung des Themas, die Beratung und wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung der Dissertation sowie für die Unterstützung während der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Für die Bereitstellung der Blutproben und fachliche Beratung danke ich Herrn Prof. Dr. med. G. Zwacka aus der Kinderklinik des Robert-Koch-Krankenhauses in Apolda.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die erfahrene Hilfe, Herrn Dipl. Biol. T. Pöhlmann aus dem Plazentalabor der Universitäts-Frauenklinik, Herrn Dr. Michels für die statistische Beratung und meiner Kommilitonin und Freundin Angela Färber.

Für die Überlassung der Pollenfluginformation danke ich Frau Dr. A. Koch vom Arbeitskreis Raumklimatologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Die Durchführung der Arbeit wurde freundlich unterstützt durch ALK-Abello-Scherax (Dänemark, Spanien, Deutschland).

Ohne die Unterstützung, das Vertrauen und die Geduld meiner Familie wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen. Ihnen gebührt mein größter Dank.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr. med U.R. Markert und Herr Prof. Dr. med. G. Zwacka,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Sondershausen, den

Lebenslauf

Name	Anja Keil
Geburtsdatum/Ort	06.06.1975 in Sondershausen/Thüringen
Schulbildung	1982 bis 1986 Grundschule Sondershausen 1986 bis 1990 Polytechnische Oberschule Sondershausen 1990 bis 1991 Leistungsklasse Sondershausen 1991 bis 1994 Gymnasium Prof. Irmish Sondershausen 30.06.1994 Allgemeine Hochschulreife
Studium	Beginn WS 1994 (Oktober) Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena 21.08.1996 Physikum 24.03.1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 21.03.2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 27.11.2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Promotion	seit 03/1999 experimentelle Promotionsarbeit zunächst im ehemaligen Labor des Institutes für Immunologie der FSU Jena von Prof. Jäger; seit 2001 im Plazentalabor der Universitätsfrauenklinik von PD Dr. Markert Doktorvater: PD Dr. Markert 05/2000-09/2000 Forschungsaufenthalt an der McMaster University Hamilton, Kanada bei Dr. DA Clark, Reproduktionsimmunologisches Labor 11/2003 -08/2004 abschließende Arbeiten zur Promotion
Ärztliche Tätigkeit	04/2002 – 10/2003 Ärztin im Praktikum Chirurgische Klinik des SANA Krankenhauses Bergen auf Rügen Vollaprobation: 27.11.2003 seit September 2004 Assistenzärztin in der Chirurgischen Klinik des Rudolf-Virchow-Krankenhauses Glauchau

Sondershausen, den

Publikationen

- Wissenschaftliche Originalarbeiten: Canellada A, Färber A, Gentile T, Dokmetjian J, **Keil A**, Blois S, Zenclussen A, Miranda S, Berod L, Gutiérrez G, Markert UR, Margni RA
- Interleukin regulation of asymmetric antibody synthesized by isolated placental B cells.
- Am J Reprod Immunol. 2002 Oct;48(4):275-82
- Clark DA, **Keil A**, Chen Z, Markert U, Manuel J, Gorczynski RM
- Placental trophoblast from successful human pregnancies expresses the tolerance signaling molecule, CD200 (OX-2).
- Am J Reprod Immunol. 2003 Sep;50(3):187-95
- Abstracts: **Keil A**, Yu K, Manuel J, Levy GA, Gorczynski RM, Clark DA
- The tolerance promoting molecule OX-2 is expressed in fetal trophoblast cells that can cocoon the fetal allograft and may prevent pregnancy loss caused by cytokine-activation of FGL2 prothrombinase
- Am J Reprod Immunol, 2001, 45: 343, 46: 31
- 21st Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology.
- June 2001, Chicago, USA (Vortrag)
- VIII International Congress of Reproductive Immunology. July 2001, Opatija, Croatia (Vortrag)
- Färber A, **Keil A**, Fahlbusch B, Markert UR.
- IgA, IgG and IgM production in B cell cultures from human placentae, maternal and cord blood.
- Am J Reprod Immunol, 2001, 45: 372
- Scand J Immunol, 2001, 54 (suppl. 1, Wednesday): 101.

Canellada A, Färber A, Gentile T, Dokmetjian J, **Keil A**, Zenclussen A, Markert UR, Margni RA.

Influencia de citoquinas en la producción de IgG asimétrica por linfocitos B aislados de placenta y de sangre del cordón umbilical. Medicina, 2000, 60: 834

Reich M, Färber A, **Keil A**, Zwacka G, Markert UR.

Plasmaproteine bei Allergikern unter sublingualer Immuntherapie.

Allergo J, 1999, 8: P72

Allergo J, 2000, 9: 34, V34.

Reich M, **Keil A**, Färber A, Niess JH, Bär C, Bach C, Hunold K, Zwacka G, Markert UR.

Plasmaproteins in allergic patients after sublingual immunotherapy.

Allergy, 2000, 55 (suppl. 63): 179-180.